



# MAITRISE DES DANGERS MICROBIOLOGIQUES EN INDUSTRIE LAITIÈRE BASÉE SUR UN MODÈLE D'APPRECIATION QUANTITATIVE DES RISQUES: Application à *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé

Fanny Tenenhaus-Aziza

## ► To cite this version:

Fanny Tenenhaus-Aziza. MAITRISE DES DANGERS MICROBIOLOGIQUES EN INDUSTRIE LAITIÈRE BASÉE SUR UN MODÈLE D'APPRECIATION QUANTITATIVE DES RISQUES: Application à *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé. Statistiques [stat]. Agroparistech, 2007. Français. NNT: . tel-01160346

**HAL Id: tel-01160346**

**<https://theses.hal.science/tel-01160346>**

Submitted on 5 Jun 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

$$N^\circ / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad / \quad /$$

## THÈSE

pour obtenir le grade de

# Docteur

de

**l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement  
(Agro Paris Tech)**

Spécialité : Biostatistique

*présentée et soutenue publiquement par*

**Fanny AZIZA-TENENHAUS**

**le 20 décembre 2007**

# MAITRISE DES DANGERS MICROBIOLOGIQUES EN INDUSTRIE LAITIÈRE BASÉE SUR UN MODÈLE D'APPRECIATION QUANTITATIVE DES RISQUES

## Application à *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé

Directeurs de thèse : **Moez SANAA** et **Jean-Jacques DAUDIN**

*Travail réalisé à l'ENVA, Unité Epidémiologie et Analyse des Risques, 94700 Maison Alfort*

*Devant le jury :*

M. Zwietering	Professeur - Université de Wageningen (Pays-Bas)	Rapporteur
B. Carpentier	Directrice de recherche - LERQAP AFSSA	Rapporteur
M. Sanaa	Maitre de Conférences - ENVA	Directeur de thèse
J.-J. Daudin	Professeur – AgroParisTech	Directeur de thèse
E. Mettler	Chercheur – SOREDAB	Examineur
M. L. Delignette-Muller	Maitre de conférence – ENV Lyon	Examineur



***Piste 1.***

*S'il avait la foi d'Icare,  
Le sentier délacé  
Suivrait la semelle de n'importe quel  
Passant.*

Olivier Bonneteau



Je désire témoigner ici de ma reconnaissance envers tous ceux qui ont suivi, soutenu et guidé ce travail de recherche. Qu'ils en soient chaleureusement remerciés.

J'adresse une marque toute particulière de ma gratitude

à Moez Sanaa, instigateur de ce travail, pour son encadrement précieux et son accompagnement dans ma découverte du monde de la recherche,

à Jean-Jacques Daudin, pour la constance de son soutien et la justesse de ses orientations,

à Jean-Pierre Innocent, pour la confiance qu'il m'a accordée et sa motivation constante,

à Eric Mettler, pour sa disponibilité, sa rigueur scientifique et toute l'aide qu'il m'a apportée,

à Jean Berthaut, pour son impressionnante expertise et son grand intérêt pour le projet,

à Olivier Cerf, pour ses réponses instructives à mes (trop) nombreuses questions, et pour tous les moments conviviaux passés ensemble,

à Jacques Pourquié et Elisabeth Vindel, pour leur soutien et leur confiance,

à Brigitte Carpentier et Marcel Zwietering pour l'attention assidue qu'ils ont bien voulu prêter à la lecture et à la correction de ce manuscrit,

à Marie-Laure Delignette-Muller pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et sa lecture du manuscrit,

aux membres du comité de pilotage, Catherine Dervin, Isabelle Albert, Jean-Baptiste Denis, pour tous leurs conseils avisés,

à Alexandre Maffre, pour sa participation essentielle à la mise en œuvre de mes réflexions, dans une humeur toujours joyeuse,

à Emilie Rieu, pour son agréable présence, ses encouragements et ses nombreuses relectures,

à tous les membres de l'Unité Epidémiologie et Analyse des risques / Risques alimentaires, plus particulièrement Laurent Guiller, pour sa collaboration à ce travail à travers d'agréables et enrichissantes discussions,

à Corinne Sanchez, Joëlle Reitz-Ausseau et Francois Bourdichon, pour leur intérêt porté à ce travail et leur participation,

à Nadine Comparot, pour sa participation active aux expériences et ses compétences,

à Françoise Launay, pour sa disponibilité et sa gentillesse,

à l'ensemble des stagiaires et thésards que j'ai eu la chance de rencontrer pendant ces années, pour tous les agréables moments passés ensemble : Gina Zanella, Tristan Lorino, Ingrid David, Sandrine Fréret, Louis Coroller, Gaëlle Taunay-Buccalo, Selma Ben Saïd, Flavia Pudda, Almarouk Fares, Nasser Adahayum,

à Louis Dam's, pour avoir été à mes côtés pendant toutes ces années, sans relâche. Ton absence (ne) va (pas) me manquer,

à Audrey, pour sa présence, son soutien, son Amitié essentielle, tayo

à Leslie et Clara, pour leurs nombreux conseils de wonder women lors nos debriefs,

à Edgar, pour son amitié précieuse, sa générosité et son talent,

à mes parents Margareth et Lucien Aziza, pour m'avoir toujours soutenue et si justement orientée dans mes projets. Aucun mot sur cette page ne saurait exprimer ce que je vous dois, ni combien je vous aime.

à mon frère Fabien, et Stéphanie, pour leur soutien et leurs encouragements constants,

à Mamy Yéyette, la perspective de ses délicieux plats du vendredi soir me motivait pour toute la semaine,

à la famille Tenenhaus, Daniele et Michel, Emma, Philippe et Delphine, Nina et Léa, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé et leur enthousiasme contagieux,

enfin, à « mon amour, d'amour, d'amour, de ma vie », Elie, qui m'a accompagnée dans la rédaction de ce manuscrit, avec la motivation qu'il me donnait quand je le regardais, et avec toute sa dextérité lorsqu'il tapait sur mon clavier d'ordinateur.

Que le dernier des remerciements, tout particulier, soit pour Arthur, pour m'avoir accompagnée, guidée, dans cette aventure. L'amour et l'estime que j'ai pour toi sont infinis.



*A mon grand-père Fernand.*





# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>13</b>
<b>CHAPITRE I Contexte Général et Problématique .....</b>	<b>17</b>
I. L'analyse des risques au cœur des instances gouvernementales .....	17
A. L'émergence de maladies d'origine alimentaire.....	17
B. La généralisation du système HACCP.....	18
C. De l'Accord SPS à l'Analyse des Risques .....	18
D. Les options de gestion des risques microbiologiques .....	19
II. L'Appréciation des Risques Microbiologiques (ARM) .....	20
A. l'ARM, composante de l'analyse des risques.....	21
B. L'interaction entre gestionnaires et appréciateurs lors de la conduite d'une ARM.....	23
C. Les approches pour l'appréciation du risque .....	24
1) Les approches qualitative et quantitative .....	24
2) L'approche modulaire pour l'appréciation de l'exposition.....	25
D. L'intérêt de l'approche quantitative stochastique modulaire.....	25
E. La nécessaire transversalité des compétences .....	26
III. L'appréciation de l'exposition comme discipline à part entière.....	27
A. La structure des modèles d'appréciation de l'exposition .....	28
1) Revue des modèles « bactérie / produit ».....	28
2) Revue des modèles génériques.....	30
3) Améliorations possibles des modèles d'appréciation du risque .....	31
B. L'intégration des options de gestion dans les modèles .....	31
IV. Application au risque de listériose liée à la consommation de fromage .....	32
A. <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments et la listériose .....	32
1) La listériose, maladie d'origine alimentaire .....	32
2) Les personnes à risque .....	33
3) Les épidémies et les cas sporadiques de listériose.....	33
B. Le risque de listériose lié à la consommation de fromages à pâte molle au lait pasteurisé.....	34
1) Les épidémies de listériose liées à la consommation de fromages à pâte molle .....	34
2) Quelles mesures de maîtrise pour quels risques ?.....	35
3) Appréciation de l'exposition au risque de listériose lié à la consommation de fromages à pâte molle au lait pasteurisé .....	36

## **CHAPITRE II Dynamique de la Contamination au sein d'une Industrie Fromagère : Analyse**

<b>Rétrospective de Données d'Auto-contrôles pour <i>Listeria</i> .....</b>	<b>39</b>
I. Présentation et analyse descriptive des données .....	41
A. Données d'occurrence et traçabilité des souches.....	41
B. Etude descriptive .....	44
1) Qualité des données .....	44
2) Etude de la prévalence .....	46
3) Répartition spatiale d'une contamination dans l'environnement .....	50
II. Epidémiologie des souches dans l'environnement et les produits .....	52
A. Implantation de <i>Listeria</i> dans l'environnement d'une usine .....	53
B. Similarité des ribotypes dans l'environnement et dans les produits .....	54
III. Etude des facteurs de risques de contamination des produits en cours de fabrication .....	55
A. Influence des zones de l'environnement .....	55
B. Influence des catégories de prélèvement et des éléments prélevés.....	58
IV. Discussion .....	61
V. Recommandations.....	64
VI. Annexe .....	65
A. Qualité des données .....	65
B. Répartition des prélèvements de l'environnement selon l'atelier, la catégorie de prélèvement et l'élément prélevé.....	68
C. Evolution de la diversité génétique (d) et du taux de renouvellement (r) au cours du temps et par site .....	71

## **CHAPITRE III Evolution des Charges Microbiennes en Industrie Agroalimentaire : Revue**

<b>Bibliographique et Stratégie de modélisation .....</b>	<b>73</b>
I. Evolution des charges microbiennes liée au transfert de microorganismes .....	74
A. Les phénomènes de contaminations secondaires et les modèles associés.....	74
1) La recontamination .....	76
2) Contamination croisée .....	79
3) Conclusion sur les modèles de contaminations secondaires .....	82
B. Les paramètres de transfert.....	83
II. Evolution des charges microbiennes liée aux conditions environnementales .....	84
A. Croissance des bactéries.....	85
1) Contamination des denrées alimentaires solides .....	85
2) Contamination des surfaces inertes.....	92
B. Réduction de la population microbienne suite aux mesures d'hygiène .....	97
III. Proposition d'une méthodologie de modélisation.....	99
A. Exigences du modèle .....	99
1) Echelles de temps et d'espace multiples .....	99
2) Modélisation conjointe de la prévalence et de la concentration .....	100
3) Prise en compte de l'organisation spatiale des cellules en milieu solide .....	100
4) Historique de l'état physiologique des cellules .....	100
B. Stratégie de modélisation .....	100
C. Hypothèses de modélisation.....	101
1) Relatives à la structure des cellules .....	101
2) Relatives au transfert des cellules.....	101
3) Relatives à l'état physiologique des cellules.....	102

## **CHAPITRE IV Modélisation de la Contamination Croisée induite par les Soins des Fromages en Cours d'Affinage 107**

I. Soins mécaniques.....	108
A. Résumé.....	108
B. Article .....	109
II. Cas des soins manuels .....	128
A. Matériels et méthodes .....	128

1) Concept fondamental de l'étude .....	128
2) Collecte des données expérimentales.....	129
3) Modélisation du transfert de matière entre compartiments .....	131
4) Estimation des paramètres des modèles.....	135
5) Simulation de la contamination croisée .....	139
B. Résultats .....	142
1) Expérimentations .....	142
2) Estimation des paramètres.....	143
3) Simulation de la contamination croisée .....	144
C. Discussion .....	150
III. Appendice .....	151
<b>CHAPITRE V Etude des Facteurs de Risque de Listériose liés à la Consommation de Fromages à Pâte Molle au Lait Pasteurisé à Travers un Modèle d'Appréciation de l'Exposition .....</b>	<b>155</b>
I. Description du modèle .....	158
A. Configuration de l'usine.....	158
B. Description des étapes.....	159
1) Procédé de fabrication .....	159
2) Phénomènes et paramètres associés à chaque étape du procédé .....	160
3) Paramètres physico-chimiques d'une étape .....	169
C. Modélisation dynamique d'un niveau de contamination .....	169
1) Elément liquide.....	169
2) Elément solide .....	170
3) Echelles de temps .....	170
D. Modélisation des phénomènes .....	171
1) Recontamination en phase de fabrication.....	172
2) Contamination croisée au cours des soins mécaniques.....	175
3) Approvisionnement.....	180
4) Recontamination en phase d'affinage .....	182
5) Contamination croisée au cours de l'emballage .....	185
6) Réduction de la population microbienne par les mesures d'hygiène .....	185
7) Croissance des microorganismes.....	186
8) Application des stress .....	193
9) Mesure de maîtrise.....	199
II. Implémentation du modèle.....	202
A. Interface n°1 : Paramètres liés à la phase de fabrication et paramètres physicochimiques du produit .....	202
1) Paramètres d'une primo-contamination en phase de fabrication.....	202
2) Paramètres du procédé en phase de fabrication.....	203
3) Paramètres physico-chimiques du produit .....	203
B. Interface n°2 : Paramètres liés à la phase d'affinage et paramètres généraux d'une simulation .	204
1) Paramètres généraux d'une simulation .....	204
2) Paramètres de procédé liés à la phase d'affinage .....	204
3) Paramètres liés aux mesures d'hygiène .....	205
4) Paramètres d'une primo-contamination en phase d'affinage .....	205
5) Paramètres liés au transfert et la croissance des microorganismes.....	205
C. Interface n°3 : Paramètres liés aux mesures de maîtrise .....	206
III. Application.....	207
A. Scénarios simulés.....	207
1) Scénario de référence.....	207
2) Variations autour du scénario de référence .....	210
B. Résultats .....	211
1) Evolution de la contamination au cours du temps .....	211
2) Mise en évidence des leviers de maîtrise du risque .....	218

3) Le modèle en tant qu'outil de maîtrise des dangers microbiologiques .....	226
IV. Discussion .....	233
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>237</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>239</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>251</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>252</b>

# INTRODUCTION GENERALE

Les industries alimentaires ont l'obligation de prendre toutes les mesures visant à garantir la sécurité sanitaire de leurs produits. Les progrès importants réalisés en matière de sécurité microbiologique des aliments depuis 10 ans ont été accompagnés d'une multiplication des analyses effectuées par les usines sur les produits finis, les intrants et l'environnement industriel (chaîne de fabrication et locaux), pour identifier les sources de contamination et pour valider l'efficacité des mesures de maîtrise des dangers. Suite à la réduction des fréquences et des niveaux de contamination, le renforcement du niveau de maîtrise hygiénique des produits doit maintenant faire intervenir de nouveaux outils.

Les progrès de l'appréciation quantitative des risques permettent d'envisager l'utilisation de cette démarche pour obtenir des résultats pertinents en matière de sécurité alimentaire. Cette démarche constitue elle-même une composante de l'analyse des risques, nouvelle approche en matière de politique sanitaire : pour protéger le statut sanitaire des populations humaines, animales et végétales, les Etats peuvent s'opposer à des importations ou à la commercialisation de produits alimentaires, imposer des mesures de gestion collectives, si leurs décisions sont fondées sur une appréciation des risques conduite de façon scientifique et transparente. Cette approche est utilisée traditionnellement dans l'analyse des risques environnementaux, chimiques et nucléaires. Malgré son application à la contamination microbiologique des aliments depuis le milieu des années 90, elle nécessite encore des développements conceptuels et méthodologiques particuliers du fait de la nature biologique des agents infectieux. Les progrès récents en microbiologie prévisionnelle et en modélisation ont permis le développement de diverses méthodes aidant à l'appréciation quantitative des risques microbiologiques. L'approche la plus complète doit à la fois modéliser le rôle des différents types de facteurs expliquant le maintien et la dispersion de l'agent pathogène tout au long de la chaîne alimentaire, en l'appuyant sur la connaissance précise des sources de contamination et de l'ensemble des conditions subies par les

microorganismes « de la ferme à la table ». La variabilité des phénomènes biologiques étudiés et l'incertitude sur les paramètres introduits dans le modèle doivent aussi être prises en compte.

Le cas de la contamination secondaire accidentelle d'un produit au cours de sa fabrication constitue un domaine plus difficile à appréhender. Pourtant, pour les produits alimentaires fabriqués à partir de matières premières subissant des traitements de décontamination, l'impact d'une contamination secondaire ne peut pas être négligé. C'est le cas des fromages à pâte molle à base de lait pasteurisé, pour lesquels les sources de contamination accidentelle, autres que le lait cru, doivent être prises en compte.

Actuellement, aucun modèle ne permet d'estimer le risque de listériose suite à la consommation de ce type de fromage. La prise en compte de l'ensemble des sources de contamination accidentelle du produit tout au long de la chaîne de production et de consommation constitue un domaine très mal documenté, du fait du manque de données industrielles. Le développement de modèles originaux adaptés à la description de ces phénomènes multiples et complexes est nécessaire, ainsi que la synthèse et l'exploitation des connaissances scientifiques acquises dans différentes disciplines : microbiologie prévisionnelle, écologie microbienne, hygiène, technologie fromagère, modélisation, statistiques.

Le premier objectif de ce travail est une contribution méthodologique à l'appréciation quantitative du risque listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait pasteurisé. A l'aide d'un modèle d'appréciation de l'exposition, basé sur la totalité d'une chaîne de fabrication, nous cherchons à modéliser les conséquences de la survenue de *L. monocytogenes* dans l'environnement de l'usine sur la fréquence et le niveau de contamination du produit fini au moment de sa consommation, en tenant compte des mesures de maîtrise appliquées dans la réalité industrielle. Cette survenue étant elle-même un événement rare et sa fréquence d'occurrence étant mal connue, nous ne cherchons pas à en estimer sa probabilité.

Le résultat attendu d'un tel modèle n'est donc pas tant l'estimation du niveau de contamination par *L. monocytogenes* des fromages à pâte molle à base de lait pasteurisé, que la validation des modèles d'appréciation de l'exposition comme outil de gestion de la sécurité des produits dans l'industrie agro-alimentaire, ce qui constitue le deuxième objectif de ce travail. Une fois le modèle validé, l'industriel doit être capable d'identifier les leviers majeurs de maîtrise des risques de contamination dans la chaîne de fabrication et choisir des mesures de maîtrise en fonction d'un niveau de protection approprié préalablement fixé.

Le présent manuscrit est composé de cinq chapitres :

- Le premier chapitre décrit le contexte historique dans lequel l'utilisation de l'appréciation quantitative des risques s'inscrit, et tente d'identifier les besoins actuels pour cette approche. La problématique

spécifique aux fromages à pâte molle et au lait pasteurisé pouvant contenir *L. monocytogenes* est aussi décrite.

- Le deuxième chapitre est une analyse rétrospective de données d'auto-contrôles issues de plusieurs sites industriels de production fromagère. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les facteurs participant à la contamination des produits en cours de fabrication et influençant leur niveau de contamination et celui de l'environnement. Elle permet aussi d'évaluer la qualité des plans de contrôles effectués en usine et d'établir des recommandations.
- Le troisième chapitre vise à regrouper l'ensemble des connaissances, tant en microbiologie qu'en modélisation, permettant l'élaboration d'un modèle d'appréciation quantitative du risque de listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait pasteurisé. Cette étude bibliographique amène à une proposition méthodologique pour la modélisation de la contamination d'une surface.
- Le quatrième chapitre s'intéresse à une étape spécifique du procédé de fabrication : le soin des fromages en cours d'affinage. Plusieurs modèles, correspondant à des techniques différentes de soins sont proposés permettant la modélisation de la dispersion d'une contamination en cours de soins. Les paramètres de ces modèles ont été estimés à l'aide de données recueillies sur le terrain.
- Enfin, le cinquième et dernier chapitre propose un modèle complet décrivant la dispersion d'une contamination par *L. monocytogenes*, dans l'espace et dans le temps, incluant toutes les étapes du procédé de fabrication des fromages à pâte molle au lait pasteurisé, depuis la pasteurisation jusqu'à la consommation. Des exemples de résultats et d'exploitation des résultats sont fournis, mettant en évidence l'intérêt d'une telle approche dans le cadre de la maîtrise des dangers microbiens.

Cette thèse a été financée par :

- l'Association Nationale de la Recherche Technique dans le cadre d'une convention CIFRE entre SOREDAB (Société de Recherche Développement Alimentaire BONGRAIN) et l'Unité Epidémiologie et Analyse des Risques de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort (ENVA).
- la Direction Générale de l'Alimentation dans le cadre du programme Aliment Qualité Sécurité R02/12, avec pour partenaires SOREDAB, l'ENVA et la Fromagerie Berthaut.





# CHAPITRE I

## Contexte Général et Problématique

Ce chapitre a pour objectif de décrire le contexte dans lequel ce travail de thèse s'inscrit. Nous décrivons dans un premier temps l'origine de l'analyse des risques dans le cadre de la sécurité microbiologique des aliments. Puis nous tentons de mettre en évidence les avantages et lacunes des méthodes utilisées pour l'appréciation de l'exposition à un risque microbiologique. Enfin nous nous intéressons en particulier au cas du risque de listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait pasteurisé.

### **I. L'analyse des risques au cœur des instances gouvernementales**

#### **A. L'émergence de maladies d'origine alimentaire**

De tout temps, des bonnes pratiques d'hygiène, telles que la cuisson des aliments ou la conservation par le froid, ont été utilisées afin de réduire les risques sanitaires liés à la consommation d'aliments. Cependant ce n'est qu'en 1810 qu'Appert démontre la possibilité de conserver des aliments dans de bonnes conditions en les plaçant dans des bocaux fermés puis chauffés dans de l'eau bouillante. Pasteur (1822-1895), qui dément la théorie de la génération spontanée des infections, identifie les premiers microorganismes (1857-1858) et constate à travers ses travaux, dont l'objectif était de détruire les bactéries dans le vin, l'intérêt de la chaleur pour inhiber les microorganismes, voire les tuer, processus connu sous le nom de pasteurisation. Cette technologie est alors utilisée pour améliorer la propreté, le goût et la sécurité des aliments, prolonger leur vie et préserver leur qualité. En parallèle, la conservation par le froid prend son essor grâce au développement des techniques de production du froid artificiel. La pasteurisation est alors couplée à la réfrigération afin de prévenir la multiplication des bactéries non détruites et afin d'allonger le temps de conservation des aliments.

En parallèle, l'industrialisation de la chaîne alimentaire permet la fabrication de produits alimentaires à très grande échelle.

Plusieurs aspects liés à ces nouvelles pratiques ont permis l'émergence ou la réémergence de maladies d'origine alimentaire, telles que la listériose causée par *L. monocytogenes*. En effet, certaines bactéries transmissibles par les aliments, comme *L. monocytogenes*, ont la capacité de croître à des faibles températures, notamment celle des réfrigérateurs. De plus, l'allongement de la durée de conservation des produits alimentaires leur permet d'atteindre des concentrations élevées dans les aliments et ainsi provoquer la maladie qui leur est associée. Enfin, la production de masse et les modes de commercialisation des aliments ont permis l'expression de ces maladies dans la population sous différentes formes épidémiologiques : des épidémies communautaires touchant différentes populations dans une ou plusieurs zones géographiques, ou l'observation de cas sporadiques sans regroupement spatio-temporel. Dans ce contexte d'émergence de bactéries pathogènes d'origine alimentaire, couplée au développement des échanges commerciaux internationaux, la mise en place de normes internationales devient indispensable (Altekruse et al., 1997).

## **B. La généralisation du système HACCP**

Dans les années 80, le système HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), signifiant « Système d'analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise » est adopté par différentes entreprises puis devient l'approche de référence dans la maîtrise de l'hygiène des aliments. Ce système, développé initialement pour sécuriser les aliments des astronautes envoyés dans l'espace, met l'accent sur la maîtrise des procédés de fabrication. Elle consiste à identifier des dangers pour chaque étape de la chaîne de fabrication, la détermination de points critiques pour la maîtrise (CCP), la fixation de seuils critiques pour chaque CCP, la mise en place d'un système de surveillance pour chaque CCP, la mise en place de mesures correctives, l'application de procédures de vérification, la constitution d'un dossier documentant le plan HACCP et la tenue de registres (van Schothorst, 2004).

Les lignes directrices du système HACCP pour la maîtrise de la sécurité des aliments ont été adoptées par la Commission du Codex alimentarius en 1993 (Anonymous, 2003a).

## **C. De l'Accord SPS à l'Analyse des Risques**

En 1994, le GATT (accord général sur les tarifs douaniers et le commerce) et l'Accord SPS (accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires), résultat de l'acte final du Cycle d'Uruguay relatif aux négociations multilatérales sur le commerce, commencées en 1986, vont fortement influencer les activités de la Commission du Codex alimentarius. D'une part, le GATT stipule qu'il ne devrait pas exister d'obstacle à la libre circulation des denrées alimentaires. D'autre part, l'accord SPS, constituant l'exception au GATT, stipule

que les Etats doivent baser leurs mesures sanitaires et phytosanitaires sur une évaluation scientifique des risques sanitaires, afin de ne pas entraver injustement le commerce international. Plus précisément, dans le cas d'un refus d'importation d'un produit alimentaire, l'Accord SPS préconise qu'un Etat doit pouvoir montrer, à partir d'une évaluation du risque, scientifique et transparente, que le produit ne permet pas de respecter le « niveau approprié de protection » (ALOP) défini comme le niveau de protection considéré approprié par un Etat pour protéger la santé et la vie des personnes et des animaux ou préserver les végétaux sur son territoire.

Dans le cadre de cet accord, les normes, directives et autres recommandations du Codex alimentarius, y compris le système HACCP, deviennent la référence officielle pour la production d'aliments salubres. De plus, l'évaluation scientifique des risques, qui était, pour sa part, une approche recommandée depuis 1955 par la FAO et l'OMS dans le cadre de l'évaluation de l'innocuité des additifs alimentaires, devient une des thématiques prioritaires de la Commission du Codex alimentarius.

Ainsi, en 1995, la première consultation d'expert, organisée dans le cadre de la 41<sup>ème</sup> session du Comité exécutif de la Commission du Codex alimentarius, définit les termes de l'analyse des risques, ainsi que les quatre composantes d'une appréciation du risque (Anonymous, 1995). S'ensuivent une série de consultations sur l'analyse des risques, la première, en 1997, établissant un cadre pour la gestion du risque (Anonymous, 1997d), la deuxième, en 1998, établissant les principes de la communication à propos du risque (Anonymous, 1997a), et enfin, depuis 1999 un grand nombre de consultations et de publications tentent de définir une stratégie pour la conduite d'une appréciation du risque à l'échelle internationale, de manière théorique et appliquée (Anonymous, 1999; Anonymous, 2002b; Anonymous, 2003c; Anonymous, 2004a; Anonymous, 2004b).

## **D. Les options de gestion des risques microbiologiques**

Dans le cadre du développement d'un protocole pour l'analyse des risques, l'attention s'est portée récemment sur l'évaluation des options en matière de gestion du risque (Anonymous, 2002a). Une appréciation du risque peut en effet déboucher sur l'identification d'un certain nombre d'options de gestion du risque lié à un aliment spécifique et à un danger microbien donné. Plus particulièrement, les options de gestion auxquelles nous nous intéressons sont liées au concept d'ALOP et à ses dérivés. L'ALOP, proposé dans l'accord SPS en 1994, est repris par l'ICMSF, qui développe le concept de « Food Safety Objectives » (FSO), dans lequel l'ALOP est converti en un niveau de danger dans un aliment (ICMSF, 2002). En effet, l'ALOP qui s'exprime par l'intermédiaire d'une « probabilité de maladie » ou encore d'un « nombre de cas par an » est difficilement maniable par les gouvernements (notamment en termes de communication) et par les industriels.

Le concept de FSO est défini dans le Codex alimentarius comme suit : « la fréquence maximale et/ou la concentration maximale d'un danger dans un aliment au moment de sa consommation, qui contribue à l'obtention du degré approprié de protection de la santé (ALOP) ».

De ce concept découlent, entres autres, les concepts d'objectif de performance, de critère de performance, de critères de produit et de critères de procédé, définis par le codex alimentarius comme suit :

- Objectif de performance (PO) : « la fréquence maximale et/ou concentration maximale d'un danger dans un aliment à une étape donnée de la filière alimentaire précédant la consommation et qui assure la réalisation d'un FSO ou d'un ALOP, selon le cas »
- Critère de performance : « effet sur la fréquence et/ou la concentration d'un danger dans un aliment qui doit être obtenu par l'application d'une ou plusieurs mesures de maîtrise pour contribuer à un PO ou à un FSO » (exemple : nombres de divisions ou de multiplications par dix de la population microbienne à une étape du procédé).

Un critère de performance peut être traduit par l'industrie, ou par les autorités compétentes, en critère de produit ou en critère de procédé, définis comme suit :

- Critère de produit : « une caractéristique physique ou chimique d'un produit qui, si elle est appliquée convenablement en tant que mesure de maîtrise, a été démontrée comme capable de satisfaire, seule ou en combinaison avec d'autres mesures de maîtrise, un critère de performance » (exemple : acidité, activité de l'eau)
- Critère de procédé : « les paramètres d'une mesure de maîtrise qui, correctement appliqués, répondent à un critère de performance, seuls ou en combinaison avec d'autres mesures de maîtrise » (exemple du barème de pasteurisation : 72°C pendant 15 secondes)

Enfin, les critères microbiologiques, permettant l'évaluation de la conformité des lots (Anonymous, 1997c), voient leur rôle élargi compte tenu de l'introduction des concepts ci-dessus (Anonymous, 2005b).

L'ensemble des options de gestion des risques microbiologiques proposés par la Commission du Codex alimentarius sont en cours de validation (à l'étape 5 de la procédure d'élaboration) et ne se sont pas encore appliqués dans les Etats. Une littérature abondante concernant ces options et leur définition est en cours de développement, notamment sur leur mise en œuvre à partir des appréciations des risques microbiologiques dans les aliment (Anonymous, 2005a; Havelaar et al., 2004; van Schothorst, 1997).

## **II. L'Appréciation des Risques Microbiologiques (ARM)**

L'appréciation des risques microbiologiques est une approche systématique permettant d'estimer le risque lié à l'exposition à un danger microbien présent dans l'aliment. Dans ce paragraphe nous définirons l'appréciation des risques comme composante de l'analyse du risque, expliquerons dans quelle mesure l'ensemble des acteurs de l'analyse des risques participe à sa conduite et enfin décrirons les différentes approches permettant sa mise

en œuvre. La formulation « appréciation des risques » sera préférée à « évaluation scientifique des risques » dans la suite du texte, bien que les deux expressions soient équivalentes.

## **A. l'ARM, composante de l'analyse des risques**

Selon la Commission du Codex alimentarius, l'établissement du niveau de risque qu'un aliment fait courir au consommateur est la première composante d'un processus plus vaste, l'analyse des risques. L'analyse des risques est un processus comportant composantes : l'appréciation des risques, la gestion des risques et la communication à propos des risques (NF V 01-002).

- L'appréciation des risques fournit une description objective et scientifique des risques d'origine alimentaire.
- La gestion du risque est un processus de pondération des choix politiques et de sélection d'options de prévention et de maîtrise appropriées qui s'appuie, si nécessaire, sur l'appréciation fournie par les experts et incombe aux autorités compétentes : les organisations gouvernementales nationales ou internationales qui veillent à la définition et l'application des mesures sanitaires.
- La communication sur les risques est un échange interactif, tout au long du processus d'analyse des risques, d'informations et d'opinions sur les dangers et les risques, les facteurs associés aux risques et les perceptions des risques, entre les responsables de l'appréciation des risques et de la gestion des risques, les consommateurs, les entreprises, les universitaires et les autres parties intéressées. La communication a notamment pour objectif d'expliquer les résultats de l'appréciation des risques et les fondements des décisions prises en matière de gestion des risques.

Plus particulièrement, l'appréciation des risques est elle-même un processus fondé sur quatre étapes, selon le Codex : l'identification des dangers, la caractérisation des dangers, l'appréciation de l'exposition et la caractérisation des risques.

Les définitions des composantes de l'appréciation des risques sont données par le glossaire Hygiène norme AFNOR NF V01/002 (2003), adaptées des définitions du Codex alimentarius :

- Identification du danger : « Identification d'un agent biologique, chimique ou physique susceptible de provoquer des effets néfastes pour la santé, et qui peut être présent dans un aliment ou un groupe d'aliments particulier ».
- Caractérisation des dangers ou Appréciation des effets : « Appréciation quantitative ou qualitative de la nature des effets néfastes pour la santé, provoqués par l'agent biologique, chimique ou physique, qui peut être présent dans l'aliment ». Les effets néfastes incluent la maladie proprement dite, l'infection, le nombre de jours d'hospitalisation, les séquelles à long terme, le coût pour la sécurité sociale, etc. En général, on cherche à établir une relation dose/effet, c'est-à-dire déterminer la relation entre l'amplitude

de l'exposition (la dose), et la gravité et/ou la fréquence des effets néfastes pour la santé qui lui sont associés (réponse).

- Appréciation de l'exposition : « Appréciation qualitative et/ou quantitative de l'ingestion probable d'agents biologiques, chimiques ou physiques par l'intermédiaire d'aliments ainsi que par l'exposition à d'autres sources s'il y a lieu ». L'objectif d'une appréciation des risques étant la mise en évidence des facteurs influençant le risque et le choix des options de gestion en conséquence, l'approche « de l'étable à la table » est préconisée, puisqu'elle permet d'inclure toutes les étapes de la chaîne de fabrication influençant le niveau du pathogène dans l'aliment : le mode de fabrication de l'aliment, la population pour laquelle on cherche à estimer le risque, les modes de conservation, de préparation et de consommation de l'aliment.
- Caractérisation des risques ou Estimation des risques : « Estimation qualitative et/ou quantitative, incluant les incertitudes qui lui sont associées, de la probabilité de survenance et de la gravité des effets néfastes sur la santé, connus ou potentiels, d'une population donnée, et basée sur les trois précédentes composantes de l'appréciation des risques ».

Le principe de l'appréciation des risques a été développé dans différents domaines et par différentes instances nationales et internationales. A titre d'exemple, l'Académie Nationale des Sciences des Etats-Unis, le comité du NRC (National Research Council), a depuis 1983 élaboré des recommandations et une terminologie sur les risques chimiques, qui ont été reprises et adaptées par la FAO/OMS dans le cadre de l'analyse des risques pour la sécurité sanitaire des aliments. En s'inspirant du modèle Covello-Merkhofer (Covello and Merkhofer, 1993), l'OIE (Office International des Epizooties) propose des recommandations et une terminologie adaptée à la santé animale. D'autres organisations ont également proposé des guides adaptés à d'autres domaines : l'IPPC (International Plant Protection Convention) pour la santé des plantes, le département de l'eau de l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis pour les risques environnementaux, par exemple.

Les intérêts de l'appréciation des risques sont multiples. D'une part, elle implique une organisation systématique des informations disponibles et une structuration des connaissances. D'autre part, ses résultats permettent d'identifier les pistes de recherche et de prendre des décisions basées sur des résultats scientifiques et transparents.

## **B. L'interaction entre gestionnaires et appréciateurs lors de la conduite d'une ARM**

L'ARM est conduite de manière transparente et indépendante par des experts mais ne doit pas exclure l'interaction indispensable entre appréciateurs et gestionnaires du risque. Son objet consiste à fournir une interprétation objective des données scientifiques pertinentes afin d'aider le gestionnaire du risque à prendre des décisions en connaissance de cause (Anonymous, 2002a). Pour cela, les objectifs d'une ARM doivent être clairement définis avec les gestionnaires du risque.

En fonction du risque que l'on cherche à estimer, il conviendra de choisir avec les gestionnaires les composantes de la chaîne de fabrication agroalimentaire à intégrer dans l'ARM.

Par exemple, si l'objectif est l'identification d'aliments à risque pour une maladie donnée associée à une bactérie pathogène donnée, une analyse des données sur la contamination des produits finis et l'exploitation des résultats d'enquêtes épidémiologiques cas/témoins ou exposés/non exposés peuvent suffire (Rocourt et al., 2003). L'établissement d'associations statistiques entre la contamination des aliments et l'apparition des effets néfastes chez l'homme nécessite l'existence de systèmes de surveillances épidémiologiques performants.

Si l'objectif est la définition d'options de gestion à différentes étapes de la chaîne de fabrication, l'interaction entre appréciateurs et gestionnaires du risque est nécessaire puisque le choix des étapes de la fabrication à intégrer dans l'appréciation du risque requiert la définition préalable des options de gestion que l'on veut véritablement tester ou évaluer. Aussi, l'interaction entre appréciateurs et acteurs de l'industrie est déterminante dans ce processus, d'une part, pour la collecte des données, d'autre part, parce que les industriels sont plus à même de fournir les informations pertinentes sur les étapes de leur procédé de fabrication qu'on souhaite intégrer dans l'analyse. De plus, les résultats pourraient être utilisés par l'industriel pour l'identification des points critiques pour la maîtrise lors de la mise en place d'un plan HACCP dans une usine, ou encore la définition de ses mesures de maîtrise, points sur lesquels nous reviendrons plus tard dans ce chapitre.

Si l'objectif est l'exportation de denrées alimentaires vers un autre pays, les gestionnaires du risque doivent connaître les composantes de l'appréciation du risque, afin de mieux pouvoir défendre leurs intérêts.

Enfin, l'interaction entre les gestionnaires et les appréciateurs du risque est aussi nécessaire dans le cas où de nouvelles informations et/ou données sont disponibles, même après l'achèvement de l'appréciation des risques. En effet, les résultats d'une ARM doivent être constamment revus et réévalués, après que l'ARM ait été adaptée à ces nouvelles informations et/ou données.



## C. Les approches pour l'appréciation du risque

### 1) Les approches qualitative et quantitative

La conduite d'une appréciation des risques peut se faire de manière qualitative ou quantitative (Coleman and Marks, 1999). Pour l'approche quantitative, le risque estimé peut être déterministe ou stochastique.

L'approche qualitative permet de développer une base de connaissances sur le risque étudié (littérature existante, données disponibles) et de distinguer les séquences d'événements entraînant le risque. Une approche intermédiaire, semi-quantitative, consiste à traduire des opinions et des informations qualitatives en mesures semi-quantitatives, à convertir une compréhension conceptuelle en modèle et à développer un système synthétisant des formulations qualitatives (Ross and Summer, 2002; Sauli et al., 2003; Tuominen et al., 2003). Les modèles souvent utilisés dans ces contextes sont les arbres d'événements, les arbres de défaillance, les diagrammes de causes à effets ou encore les diagrammes d'influence (van Schothorst, 1997). Ces deux approches sont intéressantes lorsque peu de données quantitatives sont disponibles mais un des désavantages est qu'elles laissent place à la subjectivité des informations considérées. Par exemple, la traduction en mesures semi-quantitatives des opinions d'experts reste difficile même si un référentiel est défini au préalable.

L'approche quantitative permet de traduire des données et des informations quantitatives et de les incorporer dans un système d'équations mathématiques, constituant un *modèle*, qui mettent en relation les éléments contribuant au risque. Dans le cadre d'une appréciation du risque, qui requiert de la transparence, l'approche quantitative est adéquate puisqu'une justification scientifique et objective des résultats peut être fournie. Le risque estimé peut être déterministe ou stochastique, en fonction du contexte. Dans le cas déterministe, les calculs sont faits avec des valeurs ponctuelles, par exemple, des moyennes, ou des valeurs représentant « les pires cas ». Dans le cas stochastique, on tient compte de la variabilité et de l'incertitude associée aux données. La variabilité est inhérente au phénomène étudié. Elle est due d'une part à la dispersion naturelle d'une mesure, qui ne peut être réduite grâce à un plus grand échantillon (exemple : la taille des gens dans une population) et d'autre part, à la dispersion des résultats d'une expérience aléatoire (exemple : le nombre de bactéries contenues dans un volume dont on connaît la concentration) qui peut être décrite par des processus stochastiques connus. L'incertitude est induite par les erreurs de mesures, ou encore la confiance accordée aux données. Ces sources de variations peuvent être représentées par des distributions de probabilités.

La forme générale d'un modèle stochastique est :

$$\text{Risque} = f(X_i; K; X_i; K, X_p),$$

où  $f$  est la fonction mathématique reliant les éléments ou variables  $X_i$  entrants (input) au risque (output). La fonction  $f$  est généralement non linéaire et les  $X_i$  sont des variables aléatoires continues ou discrètes. L'étude

des caractéristiques du modèle nécessite, soit des calculs d'intégrales multiples pour la caractérisation de la distribution du risque, soit des équations aux dérivées partielles pour l'étude de sensibilité du modèle. La résolution analytique est le plus souvent impossible. C'est pour cette raison que l'on fait le plus souvent appel aux simulations de Monte-Carlo, qui reste l'approche la plus utilisée aujourd'hui pour l'appréciation quantitative des risques microbiologiques dans les aliments (Cassin et al., 1998b; Parsons et al., 2005; Vose, 1998; Vose, 2000). Le choix des distributions de probabilités et la description des sources d'incertitude et de variabilité sont primordiales pour la compréhension et l'évaluation des modèles (Anonymous, 1997b).

## **2) L'approche modulaire pour l'appréciation de l'exposition**

La dernière étape de l'appréciation du risque, l'estimation du risque doit permettre aux gestionnaires de définir et faire appliquer des options de gestion concernant la présence de l'agent pathogène dans l'aliment. A partir de 1995, les premières appréciations d'un risque microbiologique conduites tiennent donc compte de l'ensemble de la chaîne de fabrication. L'approche modulaire, où chaque module décrit une étape de la chaîne de fabrication a été naturellement utilisée (Bemrah et al., 1998; Cassin et al., 1998a; Whiting, 1997). Dans le cadre quantitatif, chaque module comprend des entrées et des sorties (variables) et des paramètres liés au phénomène modélisé. Les valeurs des variables sont estimées de manière indépendante pour chaque module et combinées par les équations mathématiques du modèle. Ce processus, appliqué successivement aux différents modules, fournit ainsi le risque final. En général, les variables sont le pourcentage de produits contaminés et la concentration dans le produit.

## **D. L'intérêt de l'approche quantitative stochastique modulaire**

Une difficulté actuelle de l'approche quantitative est le manque de données et leur faible qualité. La conduite d'une appréciation quantitative peut parfois induire des coûts élevés liés à la collecte des données pertinentes pour l'analyse. Ainsi, les approches qualitative et semi quantitative représentent un intermédiaire avant la conduite d'une appréciation quantitative du risque puisqu'elle peuvent orienter les décisions concernant les ressources à investir dans la collecte de données (van Gerwen et al., 2000). Cependant, l'approche quantitative présente de nombreux avantages dans le cadre de la gestion des risques (mise en place des objectifs de performances), et la mise en place des plans HACCP.

L'appréciation quantitative des risques de la ferme à la table, faisant intervenir des variables ou facteurs à différentes étapes de la chaîne de fabrication, permet d'analyser la relation entre ces variables ou facteurs et le risque pour le consommateur. De plus, elle permet la comparaison et la hiérarchisation des étapes dites « sensibles », et par conséquent, peut suggérer l'approfondissement des recherches pour une étape donnée de la chaîne. Ainsi, elle représente une extension à l'approche qualitative du système HACCP pour l'identification

des points critiques pour la maîtrise des dangers (Buchanan and Whiting, 1998; Cassin et al., 1998b; 1995; Serra et al., 1999)

D'autre part, grâce à la mise en œuvre des bonnes pratiques d'hygiène et des principes HACCP, on observe aujourd'hui des fréquences et des niveaux de contamination très faibles. Ainsi, les probabilités de détection dans les produits ou dans l'environnement de fabrication sont considérablement réduites avec les plans d'échantillonnage traditionnels. Or, il n'est nullement envisageable de recommander aux entreprises qui ont bien progressé de multiplier par un facteur 10 ou 100 leur budget d'analyses microbiologiques pour détecter des niveaux de présence de microorganismes probablement compatibles avec la sécurité des consommateurs, mais pouvant être à l'origine d'un certain nombre de cas sporadiques. Les modèles de simulation de Monte Carlo peuvent contribuer à mieux analyser ce type d'évènements rares et à faciliter la prise de décision concernant le maintien et/ou le renforcement des mesures de maîtrise hygiénique des produits.

Enfin, il est recommandé aux appréciateurs que les résultats concernant le risque soient accompagnés de leur niveau d'incertitude. L'approche stochastique est alors une méthode de choix puisqu'elle permet justement de tenir compte de l'incertitude et de la variabilité résultant des données utilisées et des phénomènes considérés. De plus, certaines techniques d'analyse des résultats d'appréciation du risque basés sur des simulations de Monte Carlo (analyse de sensibilité) permettent de séparer ces deux sources de variations du risque, et de quantifier l'influence des différents paramètres sur le risque final (Frey and Patil, 2002; Zwietering and van Gerwen, 2000).

## **E. La nécessaire transversalité des compétences**

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, l'approche quantitative stochastique modulaire a été adoptée par l'ensemble de la communauté des appréciateurs du risque. Les outils nécessaires pour la construction d'une telle appréciation des risques sont multiples et font donc intervenir une variété de connaissances et de compétences transversales.

A ce jour, les microbiologistes ont étudié un grand nombre de bactéries pathogènes au travers d'expériences en laboratoire afin de comprendre leur comportement dans certaines conditions, leurs particularités, leur virulence, leur résistance ou encore leurs besoins. Les méthodes de détection et de caractérisation se sont aussi considérablement améliorées notamment avec les techniques PCR (Polymerase Chain Reaction) et immuno-enzymatiques (Vidas). Grâce à ces méthodes, l'on est capable aujourd'hui d'identifier les sources de contamination des produits au cours de la chaîne de fabrication et de caractériser les cellules contaminantes au sein d'une industrie alimentaire.

En parallèle, les microbiologistes ont développé, en collaboration avec des mathématiciens, des modèles mathématiques simulant le comportement des bactéries. Les comportements étudiés sont les cinétiques de destruction physique, chimique ou thermique, les cinétiques de croissance en fonction de paramètres environnementaux, ou encore les temps de reprise de croissance engendrés par les stress environnementaux tels que les désinfections ou l'application d'un agent acide par exemple. Ces modèles, dits de *microbiologie prévisionnelle*, ont pour objectif de prévoir la concentration d'une bactérie pathogène dans un produit lorsque ses caractéristiques physico-chimiques sont connues. Ainsi, l'on est aujourd'hui capable de prévoir, avec une relative incertitude, le comportement des bactéries dans un environnement donné.

Dans le cadre d'une appréciation quantitative des risques, l'identification des sources de contamination permet d'orienter le choix des étapes à intégrer dans un modèle, et la microbiologie prévisionnelle permet la modélisation du comportement des bactéries en fonction des paramètres physico-chimiques des produits et de l'environnement industriel.

En parallèle, les *techniques mathématiques* pour l'industrie agroalimentaire, autres que les modèles de microbiologie prévisionnelle, se sont aussi considérablement développées ces dernières années. Concernant la détection des contaminations par des pathogènes dans l'environnement ou dans les produits, la théorie des *plans d'échantillonnage* et des cartes de contrôle permet leur optimisation. De même, les *statistiques*, utilisées pour les ajustements des distributions de probabilité sur les données et pour leur traitement ou pour la prise en compte de processus stochastiques, font partie intégrante des compétences nécessaires en appréciation quantitative des risques. Actuellement, la théorie *bayésienne* se popularise, notamment pour l'estimation des paramètres de croissance, ou encore l'estimation de la relation dose-réponse. De plus, les résultats générés par les simulations de Monte Carlo nécessitent d'être synthétisés pour être analysés, à l'aide des techniques d'*analyse de sensibilité* des modèles par exemple.

Enfin, l'implémentation d'un modèle d'appréciation quantitative des risques est possible grâce à la puissance de calcul des ordinateurs actuels et à la programmation. Ainsi, la mise en œuvre d'une appréciation quantitative du risque requiert la connaissance de l'outil informatique et d'un langage de programmation.

### **III. L'appréciation de l'exposition comme discipline à part entière**

L'appréciation de l'exposition constitue une phase importante d'une appréciation du risque. Elle permet à terme d'estimer la dose d'agents pathogènes ingérée par le consommateur. Les sources de contamination des produits de la ferme à la table étant multiples, il s'agit au préalable de choisir les éléments à intégrer dans

l'appréciation de l'exposition puis de les modéliser. Cela requiert donc une connaissance pointue du processus de fabrication, depuis la matière première jusqu'au mode de préparation du produit chez le consommateur.

De plus, l'appréciation quantitative du risque étant une science encore jeune et en cours d'évolution, la méthodologie est peu standardisée. Dans cette partie, nous décrivons l'« état de l'art » des modèles d'appréciation de l'exposition et mettons en évidence, au travers d'exemples, les lacunes et manquements des modèles actuels.

## **A. La structure des modèles d'appréciation de l'exposition**

Les modèles d'appréciation quantitative du risque ont, dans un premiers temps, été appliqués à des couples spécifiques « bactérie/produit » puis la méthodologie a tenté d'être généralisée pour plusieurs dangers et différents produits, notamment au travers d'une approche modulaire.

### **1) Revue des modèles « bactérie / produit »**

Une grande partie des modèles publiés (à partir de 1995) est de ce type. Quand le niveau d'exposition n'est pas étudié directement à partir de données collectées dans des produits finis (Lindqvist and Westöö, 2000), les modèles estiment le niveau de contamination initial de la matière première et évaluent l'évolution de ce niveau tout au long de la chaîne de fabrication. Plus spécifiquement, sont étudiées le pourcentage de produits contaminés (souvent appelée « prévalence ») et le niveau de contamination d'un produit contaminé. Le plus souvent, le niveau de contamination est exprimé sous la forme d'une concentration en unités formant colonie (UFC) par gramme ou par millilitre. Les étapes considérées sont généralement la production primaire, la transformation, le transport, la distribution, et la préparation chez le consommateur.

A l'étape de production primaire, la prévalence et la concentration de l'agent pathogène dans la matière première sont estimées à l'aide de résultats d'analyses microbiologiques. Ces estimations peuvent s'avérer complexes du fait de l'agrégation des unités de production en différents groupements (tank à lait de ferme/lait de mélange, bovins/cheptels, poule/œuf, par exemple), de la sensibilité et spécificité des tests utilisés et des biais induits par les plans d'échantillonnage (Anonymous, 2002b).

La croissance des bactéries pathogènes dans les produits peut être calculée depuis l'étape de transformation jusqu'à l'étape de conservation chez le consommateur. Divers modèles de microbiologie prévisionnelle sont utilisés, dont les paramètres sont estimés à partir de données expérimentales ou issues de la littérature : le modèle exponentiel appliqué avec un temps de latence (Ebel et al., 2004; Lindqvist et al., 2002; Nauta, 2001; Oscar, 2004; Whiting, 1997) ou sans temps de latence (Bemrah et al., 1998), le modèle de Gompertz (Cassin et

al., 1998a), les modèles secondaires tenant compte de l'influence du pH et de la température et de la dynamique des conditions environnementales (Sanaa et al., 2004). La diminution de la concentration lors d'une étape d'inactivation (cuisson, pasteurisation) est modélisée à l'aide du modèle de destruction thermique de Bigelow (cinétique du premier ordre), en conditions dynamiques (Bemrah et al., 2003), ou non (Malakar et al., 2004; Nauta, 2001; Oscar, 2004; Whiting, 1997).

La modélisation de l'évolution de la prévalence lors de la fabrication rend les modèles plus complexes et les équations utilisées sont en général spécifiques au produit étudié et à son procédé de fabrication. Lors de certaines étapes, la taille de l'unité d'intérêt change du fait du découpage d'un produit en sous-produits (partitionnement) ou encore du mélange de produits. A titre d'exemple, le lait collecté dans plusieurs fermes, mélangé dans une grande citerne puis réparti dans plusieurs bassines pour la fabrication de fromage, ou encore le mélange de viande provenant de différentes carcasses pour la fabrication de steaks hachés, sont des étapes induisant un changement d'unité d'intérêt dans les modèles d'appréciation de l'exposition. Les conséquences directes sur la prévalence des unités contaminées sont généralement prises en compte dans les modèles d'appréciation de l'exposition lorsque la contamination est supposée homogène dans les unités et que ces dernières sont de même taille. Elle présente dans ce cas peu de difficulté de modélisation (Malakar et al., 2004; Sanaa et al., 2004). Dans d'autres situations (quand les bactéries ne sont pas réparties aléatoirement et forment des agrégats, ou quand les unités de production sont de tailles différentes), la modélisation s'avère plus complexe (Nauta, 2005; Ranta and Majjala, 2002).

La prévalence des produits contaminés peut aussi varier lors de certaines étapes du procédé de fabrication ce qui aura une influence sur le transfert des bactéries pathogènes considérées. Un transfert peut se produire entre l'environnement et un produit en cours de production, par contact direct (machine/produit, personnel/produit) ou indirect (sol/aérosol/produit) ou lors d'un contact entre deux produits. Une mauvaise application des bonnes pratiques d'hygiène et/ou un procédé favorisant les contacts entre produits peuvent être à l'origine de tels transferts. Les vecteurs ou sources de contaminations sont multiples : air, personnel, sol, machines (den Aantrekker et al., 2003a; Midelet and Carpentier, 2002; Reij et al., 2004; Tompkin, 2002). Le plus souvent, ces phénomènes de contamination secondaire sont décrits qualitativement et les auteurs considèrent que leur impact est négligeable par rapport à la croissance ou à l'inactivation des cellules présentes initialement dans la matière première contaminée. A ce jour, seules quelques études ont tenu compte de ces contaminations secondaires à cause du manque de données et la difficulté de modélisation (Cassin et al., 1998a; den Aantrekker et al., 2003a; Duffy and Schaffner, 2002; Gallagher et al., 2003; Ivanek et al., 2004; Majjala et al., 2005; Nauta et al., 2005b; Rosenquist et al., 2003; Schaffner, 2004).

Dans le cas des produits carnés, la modélisation des contaminations secondaires est plus avancée. En effet, la contamination des carcasses se produit principalement à l'abattoir. Une carcasse contaminée peut l'être par l'environnement comme décrit plus haut mais le facteur de risque principal reste l'éviscération et les procédés

associés. En effet, les matières fécales de l'animal peuvent contaminer la surface de la carcasse. Ce phénomène a été intégré dans des modèles d'appréciation du risque, empiriquement, c'est-à-dire à partir de données expérimentales sur la prévalence de contamination des animaux avant abattage et celle des carcasses résultant de l'abattage (Ebel et al., 2004), ou sous forme de facteur multiplicatif regroupant les phénomènes de contamination possible des carcasses par les fèces de l'animal pendant l'abattage et le mélange des carcasses contaminées (Cassin et al., 1998a). La lacune de ces modèles réside dans le fait que le niveau de contamination des carcasses est estimé indépendamment de la prévalence, alors qu'il dépend du nombre d'agents pathogènes transférés. (Nauta et al., 2005b) ont proposé un modèle mécanistique (dans lesquels les paramètres ont un sens physique ou biologique) basé sur la proportion d'agents pathogènes transférés. Dans ce cas, le niveau de contamination des carcasses et la prévalence ne sont pas estimés indépendamment. Ce modèle intègre aussi la contamination de l'environnement dans l'abattoir et la contamination d'une carcasse à l'autre par son intermédiaire. De la même manière, une proportion des agents pathogènes présents sur la carcasse en cours de traitement est transférée à l'environnement et une proportion des agents pathogènes présents dans l'environnement est transférée à la carcasse. Ce phénomène de contamination entre les carcasses et par l'intermédiaire de l'environnement avait déjà été pris en compte par Rosenquist et al., mais de manière empirique (Christensen et al., 2001; Rosenquist et al., 2003).

De tels transferts peuvent aussi se produire lors de la préparation des aliments. Dans ce cas, les modèles intègrent des taux de transfert entre produits, surfaces et ustensiles estimés lors d'expériences en laboratoire (Kusumaningrum et al., 2003; Mattick et al., 2003). Les études publiées modélisent le plus souvent la probabilité et le niveau de contamination d'un produit annexe au produit d'intérêt par l'intermédiaire d'ustensiles et/ou de surfaces (Anonymous, 2002b; Christensen et al., 2001; Hope et al., 2002; Kusumaningrum et al., 2004; Oscar, 2004).

Bien que la prise en compte de la variation de la prévalence induite par les transferts des bactéries soit moindre par rapport à celle de la variation de la concentration induite par les étapes d'inactivation et de croissance, la bibliographie récente montre de plus en plus d'intérêt pour les contaminations secondaires (den Aantrekker, 2002; Pedroso, 2005; Reij et al., 2005).

## **2) Revue des modèles génériques**

Il existe quelques tentatives de généralisation de la méthodologie pour l'appréciation de l'exposition (Marks et al., 1998; McNab, 1998; Nauta et al., 2001; van Gerwen et al., 2000). Cependant, l'application systématique des modèles proposés à l'ensemble des procédés de fabrication reste difficile du fait de la diversité des procédés industriels dans l'industrie alimentaire. L'approche « Modular Process Risk Model » (MPRM), présente pourtant un intérêt d'une part parce que sa structure est indépendante des données disponibles pour

l'étude, d'autre part, parce qu'elle répertorie de manière systématique l'ensemble des événements pouvant influencer le risque final (Nauta, 2001). Elle permet la prise en compte de l'incertitude et de la variabilité. Enfin, elle suggère l'utilisation de modèles mécanistiques.

L'approche MPRM approuve l'idée de découper l'ensemble de la chaîne de fabrication en modules, comme préconisé par Cassin et al. à travers le « Process Risk Model » (Cassin et al., 1998a), et suggère d'étudier pour chacun de ces modules la relation entre leurs entrées et leurs sorties, ces dernières étant le nombre de cellules par unité de production et la proportion d'unités de production contaminées. Cette méthode recommande que la variable d'intérêt soit le nombre de cellules par unité de production et non pas la concentration. En effet, l'utilisation de nombres entiers présente l'avantage de calculs plus réalistes (prise en compte de la variabilité intrinsèque des phénomènes modélisés, modélisation des transferts, prise en compte de l'état physiologique des bactéries potentiellement contaminantes), notamment avec des faibles niveaux de contamination. Six événements basiques susceptibles de se produire à chaque module et décrivant le comportement dynamique de l'agent pathogène lors de la production sont identifiés : la croissance, l'inactivation, la partition, le mélange, le détachement, et la contamination croisée. Ces événements sont susceptibles d'influencer la prévalence des unités de production contaminées et/ou le nombre total de cellules par unité de production contaminée. Une base de modélisation est fournie pour chaque événement.

### **3) Améliorations possibles des modèles d'appréciation du risque**

Les modèles publiés sont en constante évolution et amélioration. La prise en compte de phénomènes de plus en plus complexes se généralise et les besoins sont de mieux en mieux identifiés.

Cependant, un certain nombre de phénomènes identifiés qualitativement ne sont pas encore intégrés aux appréciations de l'exposition. Par exemple, l'interaction entre les facteurs environnementaux sur la croissance des agents pathogènes dans les produits, la dynamique des facteurs environnementaux, les stress subis par les bactéries, induisant un temps de latence avant reprise de la croissance en conditions favorables, la compétition de la flore bactérienne dans l'environnement et les produits. Or, leur intégration pourrait avoir un impact considérable sur les résultats d'une appréciation de l'exposition.

De plus, les données utilisées pour l'estimation de certains paramètres devraient être collectées dans le cadre de la construction du modèle et leur variabilité et incertitude mieux décrites (Schlundt, 2000). En effet, la qualité des modèles est aussi dépendante de la qualité des données.

## **B. L'intégration des options de gestion dans les modèles**

Le premier objectif d'une appréciation quantitative du risque est l'évaluation et la définition d'options de gestion du risque par l'autorité compétente. Or comme nous l'avons vu précédemment, les avantages d'une telle étude sont multiples. Entre autre, l'approche quantitative du risque représente une avancée par rapport à



l'approche qualitative : en effet, un tel modèle permet, en théorie, de définir les étapes et stratégies d'intervention influençant le risque (Ebel et al., 2004; Nauta et al., 2001; Nauta et al., 2005a), d'évaluer les seuils critiques d'un point critique pour la maîtrise du danger. L'évaluation des stratégies d'intervention peut faire l'objet d'une étude approfondie d'une étape du procédé, pouvant elle-même être intégrée par la suite à l'étude complète de la chaîne de fabrication (Evers, 2004; Hartnett et al., 2001; Jordan et al., 1999a; Jordan et al., 1999b; Nauta et al., 2000). En termes d'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise et des actions correctives, préconisée dans le système HACCP, une seule étude illustre à ce jour cette dernière possibilité à travers le cas de *L. monocytogenes* dans les plats préparés à base de viande (Gallagher et al., 2003). L'étude intègre, entre autre, l'efficacité des mesures d'hygiène, leur fréquence, l'efficacité des plans d'échantillonnage en termes de détection des produits et des surfaces contaminés, et les actions correctives.

## **IV. Application au risque de listériose liée à la consommation de fromage**

### **A. *Listeria monocytogenes* dans les aliments et la listériose**

#### **1) La listériose, maladie d'origine alimentaire**

La bactérie *L. monocytogenes* a été décrite pour la première fois dans les années 1920, mais ce n'est que depuis la mise en évidence de l'origine alimentaire de l'infection chez l'homme, lors d'une épidémie au Canada en 1983, que la listériose a été prise en compte par les responsables de la santé publique. *L. monocytogenes* est la seule espèce de *Listeria* potentiellement pathogène pour l'homme. Elle possède de grandes tolérances de croissance et d'adaptation à des situations extrêmes ce qui en fait sa particularité et sa dangerosité (Leriché, 2000). Elle est capable de se développer entre -2,5° et 45° C (Augustin, 1999). La congélation stoppe sa croissance mais ne la détruit pas. De même, elle tolère une large gamme de pH, entre 4,6 et 9,6 (Pearson and Marth, 1990), lui permettant de survivre ou croître dans un grand nombre d'aliments. Elle est capable de se développer en présence d'oxygène mais elle est peu résistante à la chaleur et les barèmes de pasteurisation réglementaires permettent efficacement sa destruction (Bréand et al., 1998). Enfin, elle présente aussi des capacités d'adaptation à des situations extrêmes, tels que des conditions acides, des milieux salés, carencés en éléments nutritifs. Ses grandes tolérances de croissance et d'adaptation expliquent le caractère ubiquitaire de cette bactérie (sol, eaux, végétaux). Par contre, cette bactérie n'est pas particulièrement résistante aux désinfectants.

Les êtres vivants sont fréquemment exposés à de faibles doses, ce qui explique le portage digestif par 3 à 15% de la population humaine et par 5 à 25% de la population animale (Leriché, 2000). De plus, les animaux porteurs sains peuvent excréter la bactérie, ce qui explique la possible contamination des matières premières

d'aliments d'origine animale (produits laitiers, viandes). Cette source de contamination des aliments peut être à l'origine de foyers épidémiques du fait du regroupement des produits contaminés dans un même lot. L'environnement naturel ou industriel peut aussi être à l'origine de la contamination de la matière première ou des produits, mais à des plus faibles niveaux. Cette possibilité est liée au caractère ubiquitaire de *L. monocytogenes*. L'environnement industriel a notamment été identifié comme une source majeure de contamination des produits alimentaires en cours de production et doit faire l'objet d'une attention particulière en termes de sécurité microbiologique des aliments (ILSI, 2005). En effet, il représente un réservoir naturel pour cette bactérie dans lequel elle peut persister plusieurs mois, voire plusieurs années (Tompkin, 2002).

Toutes les technologies et tous les produits ne présentent pas la même sensibilité vis-à-vis de *L. monocytogenes*. Les produits associés aux risques de listériose présentent les propriétés suivantes : (1) ils ont un fort potentiel de contamination par *L. monocytogenes*, (2) ils supportent la croissance de *L. monocytogenes*, (3) ils sont prêts à être consommés (4) ils sont conservés au froid pendant de longues périodes de temps. De fait, les produits prêts à consommer ont été identifiés comme une cause majeure du risque de listériose parce qu'ils ne subissent pas de traitement de décontamination avant la consommation (Gombas et al., 2003; Hitchins and Whiting, 2001; Wilson, 1995).

## **2) Les personnes à risque**

La listériose humaine touche surtout des personnes dont le système immunitaire est affaibli ou modifié. Les principaux facteurs associés aux cas de listériose sont : l'immunodépression, la grossesse, l'âge, le diabète, l'alcoolisme et certaines maladies cardio-vasculaires. Cependant, la maladie atteint préférentiellement les nouveau-nés et les personnes de plus de 60 ans et les formes cliniques de la listériose chez l'homme sont fréquemment regroupées en deux catégories : les formes materno-néonatales et les formes non materno-néonatales. Cependant, des cas de listériose ont été observés chez des individus en excellent état de santé et chez qui aucun facteur prédisposant n'avait été constaté (ILSI, 2005).

## **3) Les épidémies et les cas sporadiques de listériose**

Dans les années 80 et 90, le nombre d'épidémies de listériose signalé à travers le monde a particulièrement augmenté. Ces épidémies successives ont conduit un certain nombre de pays à instaurer des systèmes de surveillance de la listériose. En France, depuis mars 1998, la listériose fait partie de la liste des maladies à déclaration obligatoire et sa surveillance est assurée à la fois par l'Institut National de Veille Sanitaire qui reçoit les notifications et les questionnaires alimentaires et par le Centre National de Référence des *Listeria* qui analyse les souches isolées (Goulet et al., 2004).

La majorité des cas de listériose sont sporadiques et l'origine des *L. monocytogenes* est généralement non identifiée. Une étude cas/témoins a permis d'observer des associations entre la consommation de certains produits alimentaires et l'apparition de cas sporadiques de la listériose humaine (Schuchat et al., 1992). Dans le cadre de cette étude, les cas de listériose avaient, plus fréquemment que les témoins, consommé des fromages à pâte molle et/ou des aliments achetés chez des traiteurs. 32% des cas sporadiques pourraient être attribuables à la consommation de ces types de produits. La consommation de poulets insuffisamment cuits était également un facteur de risque chez les personnes immunodéprimées. Suite à cette enquête cas/témoins, une enquête microbiologique sur les aliments recueillis dans les réfrigérateurs a été menée par la même équipe (Pinner et al., 1992). Les résultats ont montré que *L. monocytogenes* se développait sur au moins un type d'aliment conservés dans 64 % des 123 réfrigérateurs des patients et la souche responsable de la maladie a été isolée dans 33 % des 79 réfrigérateurs où *L. monocytogenes* se développait.

## **B. Le risque de listériose lié à la consommation de fromages à pâte molle au lait pasteurisé**

### **1) Les épidémies de listériose liées à la consommation de fromages à pâte molle**

Les fromages à pâte molle fabriqués avec du lait cru ou du lait pasteurisé sont des aliments prêts à consommer, se conservant sur de longues périodes dans des conditions environnementales favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. Ces produits peuvent être contaminés par la matière première (lait cru) ou par l'environnement au cours de la production et ont été à l'origine de nombreuses épidémies de listériose à travers le monde (De Buyser et al., 2001; Dufour et al., 2004; Leriche, 2000; Lunden et al., 2004). Le Tableau 1 répertorie quelques unes de ces épidémies.

**Tableau 1 Quelques exemples d'épidémies liées à la consommation de fromages à pâte molle. Les astérisques (\*) correspondent à des fromages à croûte lavée.**

<b>Pays, Fromage</b>	<b>Année</b>	<b>Nombre de cas (nombre de décès)</b>
Suisse, Vacherin*	1983-1987	122 (34)
USA, Mexican Style	1985	>142 (48)
DK, hard & blue cheese	1989-1990	26 (6)
France, Brie de Meaux	1995	33(4)
France, Pont-L'Évêque*, Livarot*	1997	15 (2)
France, Epoisse*	1999	3 (1)
USA, Mexican Style	2000-2001	3
Canada, Camembert (lait pasteurisé)	2002	19

En 2000, la France produisait plus de 450 000 tonnes de fromages à pâte molle. Dans ce contexte, les industries fromagères ont l'obligation de prendre toutes les mesures visant à obtenir la sécurité sanitaire de leurs produits, notamment la mise en place de plans HACCP.

## 2) Quelles mesures de maîtrise pour quels risques ?

Les risques encourus suite à l'introduction de *L. monocytogenes* dans l'environnement de la chaîne de fabrication sont la contamination des produits par *L. monocytogenes*, la dissémination de *L. monocytogenes* dans l'environnement et son implantation durable dans des recoins non accessibles lors des procédures de nettoyage et désinfection (anfractuosités et fissures). Ainsi, pour les fromages à pâte molle fabriqués avec du lait pasteurisé (supposé donc exempt de *Listeria*), l'impact d'une contamination secondaire doit être pris en compte (Oliver et al., 2005; Stahl et al., 1996). Ceci a été récemment illustré par le cas d'une épidémie de listériose au Canada provoquée par un fromage au lait thermisé, contaminé du fait de la présence de *L. monocytogenes* dans la solution de ferment pulvérisée à sa surface (Anonymous, 2003b).

Dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé, les niveaux de population peuvent être élevés de *L. monocytogenes*, jusqu'à  $10^6$  UFC/g. Ces niveaux sont plus variables dans les fromages à pâte molle au lait cru et dépendent du niveau de contamination de la matière première et des flores associées. La croissance de *Listeria* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé dépend de l'évolution du pH au cours de l'affinage, les flores de surface alcalinisant la pâte et permettant aux bactéries présentes de se multiplier plus rapidement près de la croûte qu'en profondeur (Ryser, 1999).

En industrie fromagère, les analyses microbiologiques des produits et de l'environnement et les mesures d'hygiène constituent les deux principales mesures de maîtrise du danger. Les mesures d'hygiène permettent l'élimination des organismes non désirables dans l'environnement de l'usine, et les analyses microbiologiques permettent, entre autres, de contrôler la présence de *Listeria* et de s'assurer de l'efficacité des bonnes pratiques d'hygiène. Pourtant, ces mesures de maîtrise laissent peu de marge de manœuvre en cas de contamination de l'environnement. En effet, si leur efficacité n'est pas avérée, aucune autre mesure ne permet d'éliminer le danger. Les conséquences d'un tel événement sur la santé publique sont les cas sporadiques de listériose non déclarés ou les foyers épidémiques, évoqués précédemment. Bien que la santé publique soit l'objectif principal des industriels de l'agro alimentaire, les coûts quotidiens engendrés pour de telles mesures ne sont pas négligeables. Pour toutes ces raisons, l'efficacité des plans de contrôle environnementaux et des mesures d'hygiène doit être optimisée pour une meilleure détection des agents pathogènes dans l'environnement et pour la prévention et l'éradication d'une contamination de l'environnement (Swanson and Anderson, 2000).

Le Tableau 2 répertorie les étapes de la chaîne de fabrication d'un fromage à pâte molle au lait pasteurisé (basé sur l'exemple du camembert), l'utilité des étapes, les conditions et événements entraînant une augmentation du risque de contamination des produits par des microorganismes indésirables, les mesures de maîtrise

généralement appliquées et les lieux de prélèvements microbiologiques ainsi que l'existence ou non d'un point critique pour la maîtrise (CCP).

### **3) Appréciation de l'exposition au risque de listériose lié à la consommation de fromages à pâte molle au lait pasteurisé**

Malgré sa faible incidence mais probablement à cause de sa forte létalité, entre 25% et 30%, *L. monocytogenes* a fait l'objet de nombreux travaux de recherche en microbiologie et en microbiologie prévisionnelle. De plus, les épidémies de listériose ayant coïncidé avec la mise en place de l'analyse des risques au niveau des instances internationales, ces recherches ont conduit à plusieurs appréciations quantitatives du risque de listériose (Anonymous, 2004b; Bemrah et al., 1998; Gallagher et al., 2003; Lindqvist and Westöö, 2000; Sanaa et al., 2004), notamment celui lié à la consommation de fromage au lait cru.

Dans ce cadre, les connaissances actuelles sur les procédés de fabrication des fromages à pâte molle au lait pasteurisé et leurs risques et celles sur *L. monocytogenes* suggèrent et permettent d'entamer une appréciation de l'exposition au risque de listériose lié à la consommation de fromages de ce type.

**Tableau 2 Description des principales étapes de la chaîne de fabrication des fromages à pâte molle et risques microbiologiques associés**

<b>Etape Fabrication</b>	<b>Utilité</b>	<b>Sources d'augmentation du risque microbiologique</b>	<b>Mesure de maîtrise</b>	<b>Prélèvements</b>
Réception du lait cru			Maîtrise renforcée de l'hygiène de l'atelier de réception du lait cru	Lait cru
Stockage Standardisation				
Thermisation	Réduction de la flore pathogène à un niveau ne permettant pas son développement pendant la phase de maturation primaire.			
Maturation primaire	Multiplication des ferments naturellement présents et/ou ajoutés dans le lait cru.	Offre des conditions de pH et T° non inhibitrices de la flore pathogène éventuellement présente.		
Pasteurisation (CCP)	Réduction du risque de transmission de germes pathogènes non sporulés		Conception, de l'installation, de la conduite, surveillance et maintenance du pasteurisateur. Cloisonnement de l'usine.	Lait pasteurisé, de l'environnement (sol, égouts, pasteurisateur)
Ensemencement Maturation	La quantité de ferments injectés doit être nécessaire à une acidification rapide et suffisante et la T° du lait doit permettre la croissance des ferments recherchée	pH, T° et état liquide du lait pendant le stockage dans les tanks offrent des conditions de croissance optimale pour des germes contaminants.	Sélection des ferments et dosage sont des points critiques. Surveillance des procédures de nettoyage et de désinfection de façon programmée. Mesure de la T° et du pH du lait. Qualité bactériologique des ferments et des autres produits.	Agitateur + environnement
Emprésurage	Permet le caillage du lait. La présure est une enzyme catalyseur issue de l'estomac des veaux.			
Coagulation Tranchage	Caillage du lait dans des bassines et tranchage à l'aide d'outils introduits dans la bassine.		Automatisation du procédé, Lavage des bassines à chaque tour de circuit. Nettoyage, désinfection du matériel et hygiène du personnel.	Environnement + couteaux utilisés pour le tranchage (s'il n'est pas automatisé) + cuves + mains et gants éventuellement

Moulage	Répartition du caillé dans des moules		Nettoyage, désinfection du matériel de moulage plateaux et stores avant chaque utilisation.	Environnement+ moules
Egouttage	Egouttage dans des salles conditionnées en T° et hygrométrie. Retournes.		Nettoyage des batteries de conditionnement de l'air. Qualité de l'air. Hygiène du personnel. Qualité bactériologique des trois éléments ci-dessus.	Retourneurs + batteries de conditionnement + air + sol + évacuation eau (égouts)
Démoulage	Les fromages sont sortis de leurs moules, soit par retournement manuel, soit par machine automatique et soulèvement par ventouse.		Mêmes précautions que pour l'égouttage.	Retourneur
Salage	Le salage est conditionné par le degré de saturation de la saumure, sa température, et le temps de trempage (de l'ordre de 40 minutes pour un camembert). Existe aussi le salage à sec.	La charge microbienne de la saumure augmente au cours du temps.	La maîtrise repose sur une rupture de cycle par un processus d'assainissement de la saumure par pasteurisation ou filtration. La périodicité des ruptures de cycles est conditionnée en fonctions des données directes ou indirectes sur sa pollution.	Saumure ou sel sec + batteries de conditionnement
Ressuyage Affinage en cave	10 à 16 jours importants pour la qualité. Consiste en retournes, pulvérisation de <i>Penicillium</i> , contact avec l'air ambiant conditionné en T° et humidité par des batteries de conditionnement.	Conditions de T° (10 à 13°C) et d'humidité (proche de la saturation) favorables au développement de <i>Listeria</i> . Nécessite (entre autres) une manipulation des produits par l'intermédiaire d'une machine ou du personnel.	Nettoyage et désinfection des locaux et du matériel de conditionnement entre chaque cycle. Surveillance de la durée d'affinage.	Sol, plafond, murs, matériel, batteries + personnel + fromages
Conditionnement	Emballage des produits.	Nécessite une manipulation des produits par l'intermédiaire d'une machine ou du personnel. Emballages porteurs de poussières qui peuvent véhiculer des germes.	Gants jetables jetés fréquemment. Hygiène du personnel. Filtration de l'air et précautions pour séparer les zones où les fromages sont nus des zones d'emballage.	Personnel + batteries de conditionnement + environnement
Stockage Expédition		T° et pH pouvant favoriser la croissance de certains pathogènes	Temps de stockage maîtrisé et vérification de la T° au chargement.	Fromages + salles de stockage

## CHAPITRE II

# Dynamique de la Contamination au sein d'une Industrie Fromagère : Analyse Rétrospective de Données d'Auto-contrôles pour *Listeria*

Bien que *L. monocytogenes* soit aujourd'hui reconnu comme une bactérie clairement pathogène, toutes les infections qu'elles provoquent ne sont pas à l'origine de maladie grave, sa détection dans un produit est immédiatement suivie d'une investigation poussée de la (des) source(s) de contamination au sein de la chaîne de fabrication. En effet, la contamination de produits alimentaires en cours de production par l'environnement est un phénomène identifié et observé dans de nombreuses industries fabriquant des produits d'origine animale (Tompkin, 2002). Deux cas se distinguent : lorsque la matière première ne subit pas de traitement de décontamination et lorsqu'elle en subit un, tel que la pasteurisation.

Dans le premier cas, les matières premières susceptibles d'être contaminées par *Listeria* (saumon, lait cru), permettent son introduction au sein de l'usine (Berrang et al., 2005). La contamination du produit fini par *Listeria* dépend alors, d'une part, du niveau de contamination initial de la matière première, d'autre part, des contaminations secondaires des produits en cours de production mettant en jeu l'environnement de l'usine. En effet, de nombreuses études montrent que les souches de *L. monocytogenes* retrouvées dans les produits finis peuvent également provenir de la chaîne de fabrication et des locaux (ci-après appelé *l'environnement*), notamment dans l'industrie laitière (Jacquet, 1993; Kells and Gilmour, 2004), l'industrie du poisson (Autio et al., 1999), et l'industrie de la viande (Thévenot et al., 2005). Dans le deuxième cas, la contamination du produit fini ne dépend que de la présence de *Listeria* dans l'environnement, et par conséquent de son introduction dans



l'environnement de l'usine puis dans le produit en cours de fabrication (Valeeva et al., 2005). C'est dans ce cadre que la présente étude s'inscrit, puisque nous nous intéressons au risque de contamination par *Listeria* des fromages au lait pasteurisé en cours de production.

L'impact de l'environnement sur la contamination du produit en cours de fabrication n'étant pas négligeable, *L. monocytogenes* fait l'objet de nombreux prélèvements dans les industries agroalimentaires. Ces prélèvements sont réalisés :

- sur les produits finis à l'occasion du contrôle libératoire des lots,
- en cours de production, sur les produits et dans l'environnement, dans le cadre d'auto-contrôles.

Leur fréquence est propre à chaque industrie. En effet, un des points du système HACCP recommande la mise en place d'un système d'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise. L'identification des sources de contamination des produits est réalisée grâce aux méthodes de typage génétique (Scott et al., 2002).

Dans l'industrie laitière plus particulièrement, la maîtrise du danger commence à la ferme et se poursuit dans les entreprises qui transforment le lait en une grande diversité de produits. L'obligation de vigilance constante a amené les entreprises à mettre en place ces procédures d'analyse et de maîtrise des dangers de type HACCP. Les auto-contrôles commencent dès l'arrivée de la matière première et se poursuivent tout au long de la chaîne afin de vérifier que les produits sont sains jusqu'à leur mise sur le marché. Le risque de contamination du produit par l'environnement augmente à mesure que la localisation du danger est proche du produit et que la conservation des produits se prolonge. Ainsi, il est nécessaire de considérer différents types de prélèvements afin de graduer le niveau de risque (Pritchard et al., 1995; Silva et al., 2003) :

- les surfaces entrant en contact direct avec le produit nu
- les zones sensibles : l'environnement des ateliers dans lesquels les produits sont entreposés à l'air libre,
- les zones non sensibles : l'environnement des ateliers dans lesquels les produits nus ne sont pas exposés ou les zones annexes (vestiaires, maintenance).

Nous disposons des données d'auto-contrôles provenant de trois usines fabriquant des fromages à pâte molle au lait pasteurisé. Ces données concernent principalement la contamination de l'environnement et des produits par des coliformes et par *Listeria*, et s'étalent sur une période d'environ 10 ans. Elles sont initialement collectées, d'une part, dans un objectif d'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise et, d'autre part, dans un objectif d'investigation des sources potentielles de contamination des produits. Ainsi, bien qu'elles présentent des plans d'échantillonnage variables au cours du temps, nous avons tenté de mettre en évidence les facteurs de risque liés à l'implantation de *Listeria* dans l'environnement industriel et à la contamination du produit en cours de production à travers une analyse rétrospective. La démarche choisie consiste à déduire de cas particuliers des principes généraux liés à la dynamique d'une contamination dans une usine fromagère.

Dans une première partie, nous présentons les données, leurs caractéristiques, intérêts, et origines, et les observations issues d'analyses descriptives. La deuxième partie vise à estimer les risques d'implantation de *Listeria* dans l'environnement d'une usine. La troisième partie met en évidence les facteurs de risque de contamination des produits par *Listeria*. Enfin, nous discutons les résultats obtenus et proposons des recommandations pour la collecte de données d'auto-contrôles dans l'environnement et les produits. Toutes les analyses sont réalisées avec le logiciel SAS Version 8.2.

## I. Présentation et analyse descriptive des données

### A. Données d'occurrence et traçabilité des souches

Des données issues de plans de contrôle dans l'environnement et dans le produit étaient disponibles pour trois usines fabriquant des fromages à pâte molle au lait pasteurisé (Tableau 3).

**Tableau 3 Sites et produits sélectionnés pour l'étude**

Site	Produit	Caractéristiques
1	1-1	Pâte molle croûte fleurie
2	2-1	Pâte molle croûte fleurie
3	3-1	Pâte molle croûte mixte

#### *Plan de contrôle Environnement*

De 1995 à 2002, on dispose du nombre d'analyses mensuelles dans l'environnement de l'usine et, parmi ces analyses, le nombre de non conformes, pour trois grandes zones de l'environnement:

- « Fabrication Salage » : environnement de transformation du lait, salage des fromages frais.
- « Affinage Emballage » : maturation des fromages en hâloirs où température et hygrométrie sont maîtrisées, emballage des fromages par l'intermédiaire de machines dans des salles spéciales.
- « Autre » : quai de réception du lait, locaux de stockage du matériel, vestiaires, quai d'expédition des produits emballés, machines de nettoyage en place. Les produits ne sont pas entreposés nus dans ces zones.

Pour chaque prélèvement, le genre *Listeria* (*L. spp.*) est recherché. Si la présence de *L. spp.* est détectée dans l'échantillon (analyse *non conforme* pour *L. spp.*), la confirmation de l'espèce se fait pour *L. monocytogenes*. Ces données sont répertoriées dans le fichier « Prévalence Environnement » dont les variables sont décrites dans le Tableau 4.

**Tableau 4 Variables du fichier « Prévalence Environnement »**

<b>Variable</b>	<b>Description</b>	<b>Modalités ou valeurs</b>
Date	Mois et année du prélèvement	de Décembre 1995 à Décembre 2002
Site	Site prélevé	Site 1, site 2 ou site 3
Zone	Zones de l'environnement	« Fabrication salage », « Affinage emballage » ou « Autre »
Bactéries	Types de bactérie recherchée	<i>L. spp</i> ou <i>L. monocytogenes</i>
Na	Nombre mensuel d'analyses	Entier positif
Nc	Nombre mensuel d'analyses non-conformes	Entier positif
%nc	Pourcentage mensuel d'analyses non conformes	Compris entre 0 et 100

Si la présence de *L. monocytogenes* est à son tour confirmée, l'échantillon fait l'objet d'un ribotypage qui fournit le (les) ribotype(s) de la (des) souche(s) présente(s). Dans ce cas, le site concerné, l'origine du prélèvement, la date de prélèvement, l'étape à laquelle le prélèvement a été effectué, ainsi que le (ou les) ribotype(s) de la (des) souche(s) sont répertoriés dans un fichier annexe « ribotype Environnement » dont un extrait est donné dans le Tableau 5.

**Tableau 5 Extrait fichier « Ribotype Environnement »**

<b>Site</b>	<b>Origine du prélèvement</b>	<b>Date Prélèvement</b>	<b>Atelier</b>	<b>Ribotype</b>
1	Aide retourne après nettoyage	11/02/99	Affinage	109S8
1	Bac eau glacée H11 215L11	03/08/99	Affinage	109S8

#### *Plan de contrôle Produits*

De la même manière, de 1995 à 2002, on dispose du nombre d'analyses mensuelles de produits et, parmi celles-ci, le nombre de non conformes. Les produits sont analysés à deux étapes de la fabrication : « Emballage » (analyse des produits finis et emballés) et « DLUO » (analyses des produits à leur Date Limite d'Utilisation Optimale).

Quatre types de bactéries sont recherchées : *L. spp.*, et, le cas échéant, *L. monocytogenes*, et les coliformes. Ces données sont répertoriées dans un fichier « Prévalence Produit », ayant la même structure que le fichier « Prévalence Environnement ».

Si la présence de *L. monocytogenes* est confirmée pour une analyse, la souche fait l'objet d'un ribotypage et le nom du produit, l'étape à laquelle le prélèvement a été effectué, la date d'analyse, et le ribotype de la souche sont répertoriés dans un fichier annexe « ribotype Produit », ayant la même structure que le fichier « Ribotype Environnement »

### Remarques

- Afin de pouvoir traiter indépendamment les données pour *L. spp.* et *L. monocytogenes* et dans la mesure où la conformité pour *L. spp.* implique la conformité pour *L. monocytogenes*, nous avons assimilé le nombre mensuel d'analyses pour *L. monocytogenes* à celui de *L. spp.* De la même manière, lorsqu'aucune analyse n'était non-conforme pour *L. spp.* un mois donné, nous avons considéré qu'aucune analyse n'était non-conforme ce même mois pour *L. monocytogenes*.
- Le seuil de non-conformité d'un produit dépend du microorganisme considéré : pour *L. spp.*, un échantillon n'est pas conforme si la présence de *Listeria* est détectée dans 25 grammes de croûte issus de 5 produits d'un même lot ; pour les coliformes, un échantillon n'est pas conforme si la concentration est supérieure à 100 UFC/g. 10 grammes d'un produit sont analysés par lot.
- Le typage des souches de *L. monocytogenes* détectées dans l'environnement et dans les produits a débuté en 1992 dans certains sites. Ainsi, les données des fichiers « Ribotype » couvrent une période de 10 ans (de 1992 à 2002) pour certains sites, plus étendue que celle des fichiers « Prévalence ».
- Certaines souches de *L. spp.* non *monocytogenes* détectées dans l'environnement et dans les produits ont été typées pour le site 2. L'utilisation de ces données pour les analyses sera précisée le cas échéant.
- Un site fabrique plusieurs produits et, pour chacun de ces produits, un fichier « Prévalence Produit » est construit. Cependant, les ribotypes des produits contaminés par *L. monocytogenes*, et dont le fichier « Prévalence Produit » n'est pas considéré dans l'étude, sont aussi répertoriés dans le fichier « ribotype Produit ». Ces données fournissent une information supplémentaire quant à la dynamique de la contamination dans une usine. Dans la suite, nous préciserons si l'on tient compte ou non de ces données complémentaires dans l'analyse.

Dans un objectif d'analyse statistique et afin d'obtenir un fichier unique « Ribotype » regroupant les fichiers « ribotype Produit » et « ribotype Environnement », les observations de ces derniers ont été standardisées selon plusieurs variables, décrites dans le Tableau 6.

**Tableau 6 Variables du fichier « Ribotype »**

Variable	Description	Modalités ou valeurs
Date	Mois et année du prélèvement	de Décembre 1995 à Décembre 2002
Site	Site prélevé	Site 1, Site 2, Site 3
Zone	Zone de l'environnement	« Fabrication salage », « Affinage emballage » ou « Autre »
Atelier	Atelier de la chaîne lors duquel le prélèvement a eu lieu	Réception, Traitement, Fabrication, Salage, Affinage, Emballage
Catégorie	Catégorie à laquelle appartient l'élément de l'environnement prélevé	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Milieu : correspond à l'environnement physique avec lequel les produits ne sont pas en contact direct</li> <li>- Personnel : correspond à des prélèvements effectués sur le personnel</li> <li>- Machine : correspond aux surfaces entrant en contact avec le produit</li> <li>- Matière première : correspond aux consommables utilisés lors de la production et entrant en contact avec le produit</li> <li>- Produit : correspond à un produit analysé au cours de la production</li> </ul>
Élément	Élément de l'environnement prélevé	<ul style="list-style-type: none"> <li>- catégorie Milieu : sol, mur, égouts, batteries de climatisation, etc.</li> <li>- catégorie Personnel : main, chaussures, etc.</li> <li>- catégorie Machine : machines d'emballage, retournes, chariots, piles, etc.</li> <li>- catégorie Matière première : lait cru, ferments, présure, saumure, emballage, etc.</li> <li>- catégorie Produit : produit 1-1, 2-1 ou 3-1</li> </ul>
Espèce	Donne ou non l'espèce de la souche détectée	<i>L. monocytogenes</i> ou <i>L. spp.</i>
Ribotype	Donne le résultat du typage de la souche détectée	Codage interne (« 109S8 », « 115S6 », etc.)

Nous avons choisi de ne pas tenir compte des données concernant la contamination du lait cru (modalités « Traitement » et « Matière première » des variables « Atelier » et « Catégorie » respectivement) par *Listeria* puisqu'il est montré que *Listeria* ne survit pas à la pasteurisation.

## B. Etude descriptive

### 1) Qualité des données

Les données en notre possession étant collectées dans un objectif industriel présentent des biais et des discordances dont nous faisons l'inventaire dans ce paragraphe.

#### - Discordances entre les fichiers « Prévalence » et les fichiers « Ribotype »

Le fichier « Ribotype » répertorie les ribotypes des souches détectées dans l'environnement et les produits, ainsi que des informations sur le prélèvement. Théoriquement, le nombre mensuel d'analyses non conformes pour l'environnement ou pour les produits correspond au nombre mensuel d'observations du fichier « Ribotype ». Or la concordance des fichiers n'est pas parfaite. Les graphiques de l'annexe (paragraphe VI.A de ce chapitre) montrent que des observations du fichier « Ribotype » manquent pour certaines périodes, notamment pour

l'environnement du site 2, et que le nombre mensuel d'observations du fichier « Ribotype » est parfois différent du nombre mensuel d'analyses non conformes. Ces différences sont attribuées au fait que la procédure d'enregistrement n'est pas toujours correctement appliquée.

De plus, en 2000 et pour le site 2, des souches de *Listeria*, non exclusivement *L. monocytogenes*, ont été typées, pour l'environnement (Figure 12) et pour le produit (Figure 13) (cf. annexe, paragraphe VI.A de ce chapitre).

- Les seuils de non-conformité sont susceptibles d'avoir changé au cours du temps, notamment pour les coliformes. Cependant, nous ne sommes pas en possession de ces informations.
- Les méthodes d'analyses microbiologiques ont évolué et, par conséquent, la sensibilité et la spécificité des tests également. L'année 1999 est celle du passage au test Mini Vidas pour *Listeria*. Les autres changements n'ont pas été communiqués.
- Il semble que pour les données du site 3, seule *L. monocytogenes* ait été analysée : sur 38 observations de pourcentages d'analyses positives, 30 sont communes à *L. spp* et à *L. monocytogenes*, notamment en zone d' « Affinage Emballage ».
- Comme évoqué précédemment, les plans d'échantillonnage évoluent au cours du temps, et en cas d'analyses non conformes. Les changements concernent le nombre d'analyses et, en cas de détection, le lieu de prélèvement, qui est alors ciblé. Nous reviendrons sur ce point.
- Bien que ces données présentent l'avantage de tracer les contaminations par *Listeria* dans l'espace et dans le temps, il est important de rappeler qu'elles ne sont qu'une représentation imparfaite de la réalité. On constate, pour le site 1, par exemple, que la contamination du produit 1-1 a été détectée en août 1998 ; puis, suite à cette détection, le plan d'échantillonnage de l'environnement a été renforcé et la « première » souche *L. monocytogenes* dans l'environnement a été détectée en septembre 1998.

En plus des biais induits par les méthodes d'analyses microbiologiques, la sélection des lieux de prélèvement et les discordances observées impliquent qu'il est difficile d'analyser conjointement les fichiers « Prévalence » et « Ribotype » et d'appliquer une approche statistique. Dans ce cadre, nous avons choisi de traiter séparément les deux types d'informations sous l'hypothèse que le fichier « Prévalence » est la référence en termes de nombre mensuel total d'analyses et de nombre mensuel d'analyses non conformes, et que les ribotypes détectés et leur lieu de détection représentent la réalité du terrain (pour l'environnement et pour les produits), aux périodes où ils sont disponibles.

Nous nous sommes affranchis des différences concernant le nombre d'analyses positives entre les deux types de fichiers en ne conservant que l'information qualitative sur la présence ou l'absence de *Listeria*.

## 2) Etude de la prévalence

### - Données d'occurrence

Le nombre total d'analyses de l'environnement et des produits entre 1995 et 2002 sont fournis par le Tableau 7 et le Tableau 8. De manière générale, le nombre total d'analyses varie en fonction du nombre d'analyses positives. En effet, la détection d'une contamination par *Listeria* dans le produit ou l'environnement entraîne immédiatement une augmentation du nombre d'analyses. Ainsi, ce nombre dépend directement des épisodes de contamination. Il dépend aussi de la taille du site, en termes de volume de production et de superficie. Ce nombre diffère donc significativement d'un site à l'autre. Enfin, ces données globales suggèrent un taux de prévalence observée faible pour *Listeria* dans l'environnement et dans le produit.

**Tableau 7 Nombre d'analyses dans l'environnement entre 1995 et 2002**

Année	Nombre annuel d'analyses			Nombre annuel d'analyses non-conformes pour <i>L. spp.</i>			Nombre annuel d'analyses non-conformes pour <i>L. monocytogenes</i>		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
1995		418	64		5	0		3	0
1996	1137	946	783	2	8	0	2	2	0
1997	1015	1159	1061	0	9	10	0	0	6
1998	1837	1109	1183	42	9	37	25	0	35
1999	7406	1204	1425	313	39	36	129	1	31
2000	7281	8391	3066	12	614	22	4	355	15
2001	5669	5706	2630	6	47	12	1	0	7
2002	5660	7998	1771	23	80	6	1	0	2
<b>Total</b>	29905	26931	11983	398	811	123	163	361	96

La correspondance, en termes de contamination, entre l'environnement et les produits n'est pas systématique et seuls les produits 1-1 et 2-1 sont contaminés par *L. monocytogenes* (à des très faibles taux de prévalence observée) lorsque l'environnement est contaminé.

**Tableau 8 Nombre d'analyses sur produits entre 1995 et 2002**

Année	Nombre annuel d'analyses			Nombre annuel d'analyses non-conformes pour <i>L. spp.</i>			Nombre annuel d'analyses non-conformes pour <i>L. monocytogenes</i>		
	Produit 1-1	Produit 2-1	Produit 3-1	Produit 1-1	Produit 2-1	Produit 3-1	Produit 1-1	Produit 2-1	Produit 3-1
1995	115	1358	422	0	1	0	0	1	0
1996	1394	3076	771	0	14	0	0	0	0
1997	1114	3020	792	0	37	1	0	0	0
1998	1082	3081	881	10	87	1	7	0	0
1999	1580	2922	758	17	18	0	15	0	0
2000	2683	2896	702	0	19	0	0	0	0
2001	2544	2701	504	0	5	0	0	0	0
2002	2252	2810	496	0	2	0	0	0	0
<b>Total</b>	12764	21864	5326	27	183	2	22	1	0

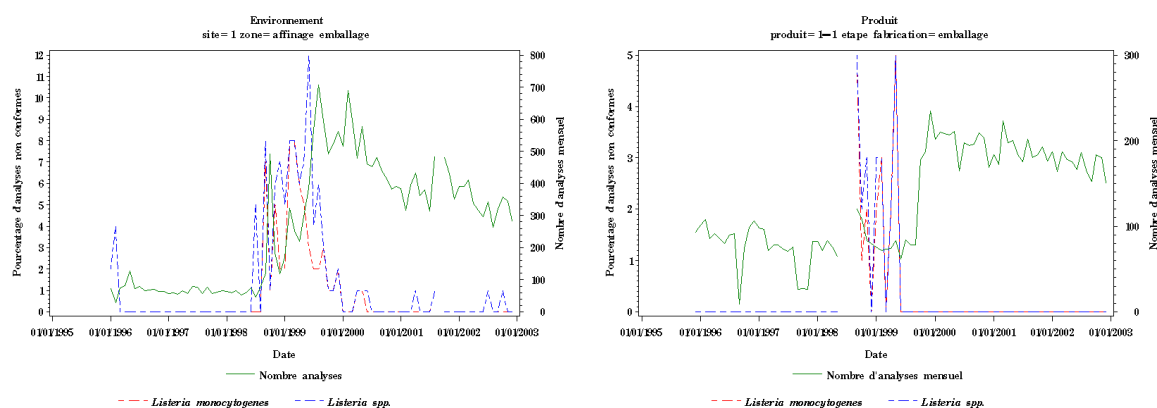
## - Représentations graphiques

Les graphiques suivants représentent l'évolution de la prévalence de contamination observée dans les produits et dans l'environnement au cours du temps. Nous parlons de prévalence observée et non réelle du fait de l'échantillonnage et des caractéristiques des méthodes d'analyse.

Nous avons sélectionné trois graphiques représentatifs des différents types de dynamique de contamination observés parmi les sites étudiés. Sur l'axe des ordonnées est représenté le pourcentage mensuel d'analyses non conformes et le nombre mensuel d'analyses, de 1995 à 2002, pour *L. spp.*, *L. monocytogenes*, par site, produit et zone de prélèvement. Deux types de dynamiques se distinguent *a priori*.

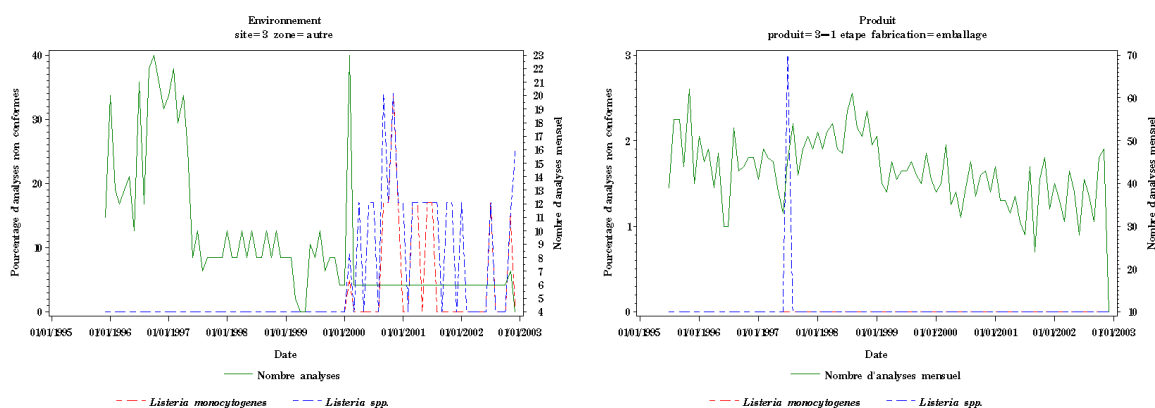
Le premier type est celui d'un environnement maîtrisé, c'est-à-dire que les analyses sont conformes pour *Listeria*, et soudainement, non conformes. L'origine de la contamination de l'environnement peut être due à l'introduction de *Listeria* dans l'environnement de l'usine couplé à une défaillance des mesures d'hygiène ou à l'activation d'un réservoir de *Listeria* déjà présent dans l'environnement de l'usine, à cause de travaux dans l'usine, une production anormalement élevée impliquant des mesures d'hygiène moins rigoureuses ou encore une période d'embauche d'intérimaires. Ce type de contamination de l'environnement est illustré par l'historique des sites 1 et 3. La contamination de l'environnement du site 1 se répercute sur celle du produit à des périodes similaires (Figure 1), mais pas celle du site 3 (Figure 2). La fin des épisodes de contamination de l'environnement et des produits n'est pas connue puisque, dans le cas du site 1, l'usine a arrêté la production pour subir une désinfection approfondie, et dans le cas du site 3, les données n'étaient pas disponibles pour les années suivant l'année 2002.

*Ce scénario est celui d'une contamination accidentelle de l'environnement par Listeria dont l'origine est inconnue et résultant en une contamination prolongée de l'environnement, avec ou sans répercussions sur le produit.*



**Figure 1 Evolution du pourcentage d'analyses non conformes au cours du temps - Site 1 et Produit 1-1**

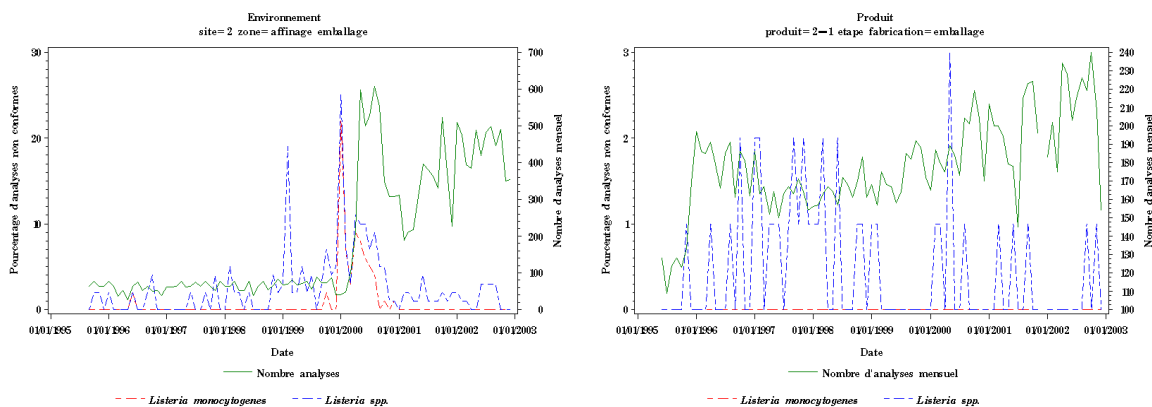




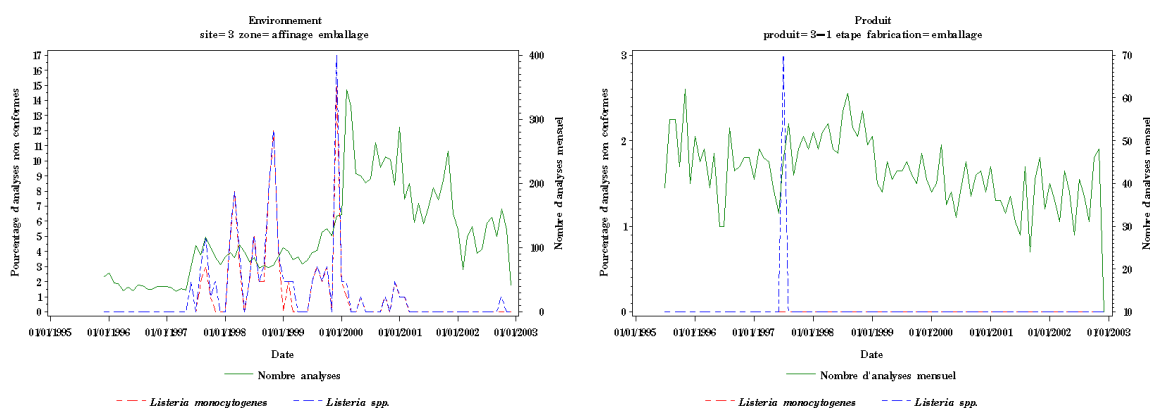
**Figure 2 Evolution du pourcentage d'analyses non conformes au cours du temps - Site 3 et Produit 3-1**

Le deuxième cas est celui d'une contamination de l'environnement régulière dans le temps avec des périodes plus fortement contaminées. L'impact sur la contamination du produit n'est pas systématique. Ce type de contamination est illustré par l'historique des sites 2 et 3. La contamination de l'environnement du site 2 coïncide avec la contamination du produit 2-1 pour *L. spp.* (Figure 3), contrairement à la contamination de l'environnement du site 3 qui n'a pas d'impact sur la contamination du produit 3-1 (Figure 4).

Ce scénario est celui d'une contamination de l'environnement sous forme de « bruit de fond ».



**Figure 3 Evolution du pourcentage d'analyses non conformes au cours du temps - Site 2 et Produit 2-1**



**Figure 4 Evolution du pourcentage d'analyses non conformes au cours du temps - Site 3 et Produit 3-1**

De manière générale, chaque site présente des comportements différents en termes de dynamique de contamination dans l'environnement et d'impact sur la contamination des produits. Une contamination peut survenir de manière soudaine et s'éteindre ou être continue dans le temps. Ceci exclut l'étude d'une tendance temporelle du pourcentage d'analyses positives de l'environnement des usines et dans les produits. Au contraire, il est important de considérer l'augmentation du nombre d'analyses de l'environnement et des produits à l'instant  $t$ , en fonction du résultat des analyses à l'instant  $t-1$ . En effet ces analyses sont effectuées dans un objectif d'évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise et d'investigation des sources potentielles de contamination des produits. Ainsi, lorsqu'une analyse n'est pas conforme, l'augmentation du pourcentage d'analyses non conformes peut être la conséquence de recherches plus nombreuses dans les zones où *L. monocytogenes* est détectée (ciblage du lieu de prélèvement), afin de s'assurer de l'éradication de la source identifiée, mais aussi par la dispersion et l'augmentation du nombre de cellules dans l'environnement. Cependant, cette distinction n'est pas quantifiable.

#### - Tests d'association

Nous avons testé l'association entre la présence de *Listeria* dans l'environnement (toutes zones confondues) et la présence de *Listeria* dans le produit (à DLUO et/ou à l'emballage), entre la présence de *L. spp.* et *L. monocytogenes*, dans l'environnement (*env*) et dans les produits (*prod*), et entre la présence de *Listeria* et celle de coliformes dans les produits.

On considère, pour un site, un mois, et une bactérie donnés, une variable dichotomique, égale à 1 si au moins une analyse dans l'environnement de ce site s'est avérée non conforme au cours du mois, 0 sinon. De la même manière, on considère, une variable dichotomique, égale à 1 si au moins une analyse d'un produit de ce site s'est avérée non conforme au cours du mois, 0 sinon. Considérons le couple de valeurs constitué des valeurs de ces deux variables, dans l'ordre où elles sont décrites. Le Tableau 9 comptabilise, lorsque c'est possible, le nombre de mois pour lesquels les situations suivantes sont retrouvées : (0,0), (0,1), (1,0), (1,1). A titre d'exemple, pour

191 mois différents, *L. monocytogenes* n'a pas été détectée dans l'environnement, ni dans un produit. Cette étude des corrélations suppose que les plans de contrôle permettent la détection d'une contamination.

**Tableau 9 Fréquence de contamination de l'environnement (« Env. ») et des produits (« Prod. ») pour *L. spp.*, *L. monocytogenes* et les coliformes.**

			<i>L. monocytogenes</i>				<i>L. spp.</i>				Coliformes		
			Env.		Prod.		Env.		Prod.		Prod.		
			0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	
			x	x	191	0	108	73	x	x	x	x	
<i>L. monocytogenes</i>	Env.	1	0	x	x	65	10	0	75	x	x	x	x
		0											
	Prod.	1	0			x	x	x	x	205	51	254	10
		0				x	x	x	x	0	10	2	0
	<i>L. spp.</i>	1	0					x	x	103	15	x	x
		0						x	x	102	46	x	x
		1	0					x	x	203	61		
		0						x	x	2	0		

Le test exact de Fisher appliqué à l'ensemble des données des sites étudiés simultanément rejette l'hypothèse d'indépendance entre la présence de *L. spp.* dans l'environnement et celle dans le produit ( $p < 0,001$ ), d'une part, et entre la présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement et celle dans le produit, d'autre part ( $p < 0,001$ ).

Ce même test appliqué à l'ensemble des produits simultanément ne rejette pas l'hypothèse d'indépendance entre la présence de coliformes et la présence *L. monocytogenes* dans les produits ( $p = 0,92$ ), et entre la présence de coliformes et celle de *L. spp.* ( $p = 0,59$ ).

Enfin, ce test appliqué à l'ensemble des données des sites étudiés simultanément rejette l'hypothèse d'indépendance entre la présence de *L. spp.* et la présence de *L. monocytogenes*, dans l'environnement et dans les produit, respectivement ( $p < 0,001$ ).

### 3) Répartition spatiale d'une contamination dans l'environnement

Les données fournissant le ribotype des souches isolées dans l'environnement permettent la traçabilité des clones de *L. monocytogenes* dans l'environnement et dans les produits. Nous avons cherché à mettre en évidence un schéma général de la dynamique de la contamination au sein d'une usine.

#### - Données d'occurrence

Le fichier « Ribotype » contient 806 observations pour l'ensemble des trois sites étudiés et sur une période maximale de 10 ans. 25% des observations concernent des souches de *Listeria* non *monocytogenes* typées en 2000 pour le site 2. Chaque observation du fichier fournit le ribotype d'une souche détectée dans l'environnement ou dans un produit, un mois donné et les informations sur la catégorie de prélèvement. Parmi ces observations, 30,81% concernent des prélèvements sur produit (tous produits confondus, incluant ceux dont

les données du « fichier prévalence » ne sont pas considérées) et 69,19% concernent des prélèvements dans l'environnement.

- Répartition des observations dans les ateliers et selon la catégorie de prélèvement

L'annexe (paragraphe VI.B du Chapitre II) fournit pour chaque site la répartition des souches selon les variables « Atelier », « Catégorie » et « Élément ».

La répartition entre les catégories « machine » et « milieu », qui représentent à eux seuls 96% des observations, est variable selon les sites. Cependant, il faut tenir compte du fait que chaque site n'est pas agencé de la même manière et que les processus de fabrication ne sont pas les mêmes. Par exemple, les machines « aide-retournes » des fromages n'existent pas pour le site 2 puisque les fromages sont retournés manuellement lors du ressuyage. Enfin, les plans d'échantillonnage ne sont pas standardisés d'une usine à l'autre.

Un test du  $\chi^2$  confirme que la répartition des souches dans les ateliers diffère significativement entre les sites ( $p < 0.001$ ). Les contaminations dans l'environnement se concentrent principalement à l'atelier « Affinage ». Ceci s'explique par le fait que la plus grande part du procédé de fabrication se déroule en hâloir d'affinage. De plus, contrairement à l'atelier « Fabrication », quotidiennement nettoyé et désinfecté et où peu de souches sont détectées (4,22% des observations), les hâloirs sont nettoyés et désinfectés à une faible fréquence puisque généralement, des lots de fromages y sont entreposés. Concernant l'atelier d'« Emballage », dans lequel les produits n'effectuent qu'un passage, il est, d'une part, le reflet de la contamination de l'atelier « Affinage », d'autre part, un lieu d'accueil favorable à *Listeria*.

Ces résultats, bien que ne tenant pas compte de la dimension temporelle des données, montrent que de manière générale, l'affinage et l'emballage sont des lieux susceptibles d'être contaminés par *L. monocytogenes*. Cependant, la fréquence des observations ne permet pas de conclure à une répartition des bactéries dans l'environnement propre ou commune aux sites. En effet, étant donné l'objectif de ces analyses, seuls les résultats positifs pour la présence de *L. monocytogenes* sont détaillés quant à la catégorie de prélèvement. Nous ne disposons donc pas du nombre total d'analyses par catégorie de prélèvement et par atelier, et ne pouvons donc pas déterminer la répartition du nombre d'analyses positives en proportion entre les ateliers ou entre les catégories de prélèvement. De plus, les plans d'échantillonnage sont modifiés lorsqu'une analyse s'avère non-conforme.

Pour s'affranchir de ce biais de sélection potentiel, nous nous sommes concentrés sur l'étude de la présence des ribotypes dans l'environnement, dans les produits et dans le temps, sans tenir compte du nombre d'observations par ribotype et sous l'hypothèse que le nombre mensuel ou annuel de ribotypes typés est représentatif de la réalité, pour les périodes où ils sont disponibles.

## II. Epidémiologie des souches dans l'environnement et les produits

Le typage des souches permet le suivi épidémiologique des souches de *Listeria* dans l'espace et dans le temps et met en évidence la nature des contaminations en fonction des sites et des ateliers. Pour l'ensemble des exploitations à suivre, nous avons défini plusieurs indices résumant l'information émergeant des données du fichier « Ribotype ». Nous avons tenu compte des données concernant *L. monocytogenes* et *L. spp.* du fichier « Ribotype », pour l'environnement et les produits, incluant ceux dont le fichier « Prévalence » n'était pas disponible. Les données concernant l'atelier « Autre » ne sont pas prises en considération dans cette étude puisque nous avons cherché à évaluer l'impact des ateliers dans lesquels le produit est exposé directement à l'environnement.

Pour chaque site, chaque année et chaque atelier, les indicateurs suivants ont été calculés, lorsqu'au moins une souche est détectée dans l'environnement au cours de l'année. Ces indicateurs sont exprimés sous forme de ratios ramenés à des pourcentages.

- La diversité génétique d:

Soit n, le nombre de ribotypes différents détectés au cours d'une même année et N, le nombre de souches typées cette même année.

$$d = \frac{n}{N} \times 100$$

- Le taux de renouvellement r :

Cet indicateur est calculé d'une année sur l'autre, de la façon suivante : soit s, le nombre de ribotypes détectés au cours de l'année A et non détectés l'année A-1, et S, le nombre total de ribotypes détectés au cours de l'année A. Plus r est grand, plus le taux de renouvellement dans l'environnement est élevé.

$$r = \frac{s}{S} \times 100$$

- Le taux d'adéquation Environnement/Produit AEP:

Soit s', le nombre de ribotypes détectés à la fois dans l'environnement (de l'ensemble des ateliers) et dans le produit, au cours d'une même année.

$$AEP = \frac{s'}{S} \times 100$$

## A. Implantation de *Listeria* dans l'environnement d'une usine

Les graphiques de l'annexe (Figure 17) représentent l'évolution des indicateurs d et r en fonction du temps et le Tableau 10 résume ces données en présentant les moyennes de d et r sur la période de 1993 à 2002, pour chaque site et atelier. Les années et ateliers sans contamination ne sont pas pris en compte dans le calcul de la moyenne.

**Tableau 10 Moyenne des indicateurs sur la période de 1993 à 2002 par atelier**

Atelier	site 1		site 2		site 3		Moyenne sites	
	d	r	d	r	d	r	d	r
Réception	100,00	100,00	66,67	100,00			83,33	100,00
Traitement	66,67	100,00	100,00	100,00			83,33	100,00
Fabrication	47,62	75,00	52,78	66,67			50,20	70,83
Salage			75,00	100,00			75,00	100,00
Affinage	50,10	57,14	58,14	75,00	44,95	66,67	51,06	66,27
Emballage	60,00	100,00	12,58	41,67	28,31	65,00	33,63	68,89

Les sites étudiés sont caractérisés par des taux de renouvellement élevés avec un minimum de 57,14% pour l'atelier d'affinage. La moyenne des taux de renouvellement sur les sites reste minimale pour l'atelier d'affinage, égale à 66,27. Cela signifie qu'environ 2 souches sur 3 isolées de l'environnement d'affinage présentent de nouveaux profils, mais cela signifie aussi que le risque d'implantation d'une souche dans l'atelier d'affinage d'une année sur l'autre serait d'environ 1/3.

Ce risque d'implantation est calculé pour les années et ateliers ayant fait l'objet de contaminations dans l'environnement d'une année sur l'autre. Or, il serait irréaliste que la seule présence d'une souche dans l'environnement favorise l'introduction de nouvelles souches. Ainsi, il concerne aussi les périodes de non-contamination et suggère que ces périodes étaient en fait des périodes de non-contamination *apparentes*. Les souches présentes à ces périodes, peuvent être qualifiées de *transitoires*. Si l'une d'elles devient *persistante*, avec une chance sur trois, sa dispersion dans l'environnement de l'usine augmente sa probabilité de détection, et le cas échéant, le nombre d'analyses dans l'environnement, permettant alors la détection des autres souches. Si aucune ne persiste, le nombre d'analyses dans l'environnement est trop faible pour les détecter et si, le nombre de ribotypes détectés au cours de l'année et non détectés l'année précédente est alors nul. Le nombre moyen de types génétiques différents isolés par an de l'atelier d'affinage, souvent inférieur à 3, expliquerait ces périodes de non-contamination *apparentes* de la zone affinage.

Les données montrent qu'un taux de renouvellement élevé implique un indicateur de diversité génétique élevé. En moyenne sur les sites, les diversités génétiques des ateliers d'affinage et d'emballage sont respectivement de 33,63% et 51,06% alors que les taux de renouvellement sont sensiblement égaux, respectivement 68,89% et 66,27%. Cette différence entre les diversités génétiques peut s'expliquer par le fait que les souches isolées de l'atelier d'emballage sont plus facilement détectées qu'à l'affinage, car elles sont le plus souvent présentes sur les

machines. La détection impliquant l'augmentation du nombre de prélèvements, l'indicateur de diversité génétique est d'autant plus réduit pour l'atelier d'emballage.

Les autres ateliers présentent globalement des taux de renouvellement et des diversités génétiques élevés, suggérant que la persistance des souches est moins importante. Cependant, *Listeria* n'a pas été isolée dans tous les sites pour ces ateliers, et, le cas échéant, le nombre d'isolats est faible.

## B. Similarité des ribotypes dans l'environnement et dans les produits

On peut constater qu'en moyenne sur les sites et les années, et en cas de contamination de l'environnement, 47,06% des taux d'adéquation environnement / produit sont nuls (l'environnement n'a pas contaminé le produit et réciproquement) et dans le cas contraire, la moyenne et l'écart-type de cet indicateur sont respectivement 34,17% et 16,22%, suggérant qu'une contamination de l'environnement n'induit pas forcément une contamination du produit à des niveaux détectables.

**Tableau 11 Moyenne des indicateurs sur la période de 1993 à 2002 par usine**

Année	Site 1		Site 2		Site 3	
	AEP	d	AEP	d	AEP	d
1993						
1994	25,00	15,38			0,00	66,67
1995	66,67*	15,00**	0,00***	33,33		
1996	0,00	66,67	0,00	100,00		
1997	0,00	100,00				
1998	50,00	58,33				
1999	25,00	51,77			33,33	11,09
2000			14,29	60,38	0,00	45,00
2001			20,00	63,86	40,00	19,23
2002	0,00	100,00	33,33	30,32	0,00	50,00

Exemples de lecture du tableau :

\* En moyenne sur les ateliers, 66,67 % des ribotypes détectés dans l'environnement du site 1 l'ont été dans au moins un produit en 1995.

\*\* En moyenne sur les ateliers, deux souches typées ont 15% de chance d'avoir le même ribotype.

\*\*\* En 1995, aucune ribotype détecté dans l'environnement du site 2 n'a été retrouvé sur un produit.

Les données du Tableau 11 mettent en évidence la liaison entre l'indicateur AEP et l'indicateur de diversité génétique, illustrée par la Figure 5. Ces deux indicateurs sont anti-corrélés avec un coefficient de corrélation des rangs de Spearman de -0,65 ( $p = 0,004$ ). En effet, comme vu précédemment, la diversité génétique apparente est très dépendante du nombre d'isolats typés et un nombre élevé d'isolats correspond souvent à l'identification de la présence d'une souche persistante dont on veut s'assurer de l'éradication, ce qui réduit la diversité génétique des souches isolées. Ainsi, plus la diversité génétique est faible, indiquant la localisation du foyer, plus l'AEP est grand ( $R^2 = 0,39$ ). Ce résultat met en évidence l'impact de la présence d'une souche persistante dans l'environnement d'un site sur la contamination des produits au cours de leur fabrication.

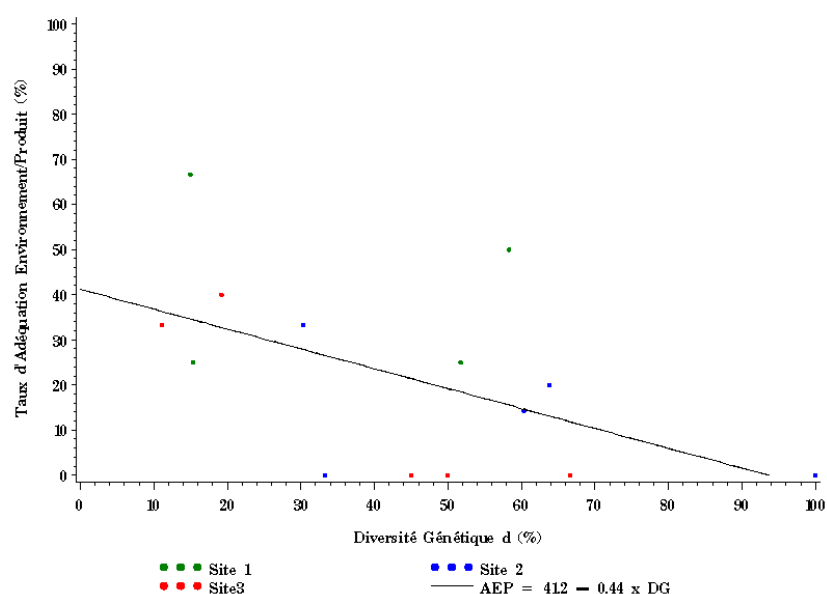


Figure 5. Taux d'adéquation Environnement Produit en fonction de la diversité génétique des souches isolées

### III. Etude des facteurs de risques de contamination des produits en cours de fabrication

L'étude suivante a pour objectif de quantifier l'impact de la contamination de l'environnement par *Listeria* sur celle du produit. Nous avons tenté, par l'utilisation de modèles statistiques, de quantifier le risque de contamination des produits finis par l'environnement en fonction de la contamination des différentes zones de l'environnement, des catégories de prélèvement, et des éléments prélevés.

#### A. Influence des zones de l'environnement

Nous avons dans un premier temps cherché à mesurer la corrélation entre le pourcentage d'analyses non conformes des différentes zones de l'environnement et celui des produits finis puis, dans un second temps, à estimer la prévalence de contamination des produits finis en fonction du statut de contamination des différentes zones de l'environnement.

Les coefficients de corrélation de rang de Spearman du Tableau 12 montrent qu'il existe bien une relation monotone croissante entre ces deux variables. Cependant, d'une part, ces coefficients sont faibles, d'autre part, l'application de modèles linéaires à ces données (modèle linéaire généralisé avec prise en compte de la corrélation entre les observations, modèle mixte avec effet aléatoire de la variable « site », régression de Poisson) n'ont pas fourni de résultats probants : les ajustements et les prévisions sur les données d'apprentissage étaient de mauvaise qualité, mettant en doute l'existence d'une relation linéaire. Nous attribuons ces résultats aux biais de sélection des prélèvements dans l'environnement, entre autres.



**Tableau 12 Corrélation entre les pourcentages d'analyses positives dans les produits et dans l'environnement**

Environnement	Produits	
	Coeff <sub>L. spp</sub> (p,n)	Coeff <sub>L. monocytogenes</sub> (p,n)
Zone « Fabrication Salage »	0,15* (0,01** ; 252***)	0,14 (0,02 ; 252)
Zone « Affinage Emballage »	0,26 (<0,0001 ; 252)	0,28 (0,0001 ; 252)
Zone « Autre »	0,16 (0,02 ; 186)	0,09 (0,17 ; 186)

\* Coeff<sub>X</sub> = coefficient de corrélation des rangs de Spearman entre les pourcentages d'analyses non conformes d'une zone de l'environnement et celle d'un produit, pour le microorganisme X.

\*\* p = niveau de risque du test d'indépendance

\*\*\* n = nombre d'observations

La représentativité de la contamination des produits étant, elle, assurée par le tirage au sort des produits finis dans les lots, nous avons choisi d'évaluer l'influence du statut mensuel de contamination des zones, égal à 1 si au moins une analyse s'est avérée non conforme dans le mois, 0 sinon, sur la proportion mensuelle d'analyses de produit non conformes. Le pourcentage d'analyses positives de l'environnement a donc été écarté de l'analyse.

Nous avons appliqué aux données un modèle de régression logistique avec pour variables explicatives le statut des zones « Fabrication Salage » et « Affinage Emballage » et leur interaction. Les données de la zone « Autre » n'ont pas été retenues car non disponibles dans leur presque totalité pour le site 2. Nous avons considéré que les trois sites traités formaient un unique site regroupant l'ensemble des événements possibles en termes de dynamique de contamination. La dimension temporelle des données n'a pas été prise en compte. En effet, la probabilité de contamination d'un produit pour un mois donné n'est pas supposée influencer celle du mois suivant, mais dépend uniquement du statut de contamination des zones de l'environnement. Ainsi, les observations étaient supposées indépendantes. Le modèle a été appliqué d'une part aux données concernant *L. spp.*, d'autre part *L. monocytogenes* ; les résultats sont donnés séparément.

Soit la variable Y correspondant au nombre de produits détectés positifs pour *Listeria* un mois donné. La loi de Y est donnée par une loi binomiale de paramètre n et  $\pi$ , où n est le nombre d'analyses de produits ce même mois et  $\pi$ , la probabilité pour un produit d'être contaminé.

$$Y \sim \text{Bin}(n, \pi)$$

Soit AE et FS, deux variables dichotomiques dont les valeurs 1 et 0 représentent le statut mensuel de contamination des zones « Affinage Emballage » et « Fabrication Salage », respectivement. Soit (x,y) un couple de valeurs possibles de AE et FS (Tableau 13).

Le modèle de régression logistique consiste à poser :

$$\log \frac{\pi(x, y)}{1 - \pi(x, y)} = \alpha + \beta x + \gamma y + \delta xy$$

L'application de ce modèle de régression logistique aux données a montré que la variable d'interaction n'apporte pas d'information. En effet, les déviations sont identiques, au passage du modèle sans interaction au modèle avec interaction, pour *L. spp.* et pour *L. monocytogenes*. Par conséquent, les résultats suivants correspondent au

modèle n'utilisant que les variables AE et FS. Les résultats sont donnés dans le Tableau 13 sous forme de prévision du pourcentage mensuel d'analyses non conformes de produits, en fonction des statuts possibles de contamination des zones de l'environnement. Pour *L. monocytogenes*, le statut des deux zones de l'environnement a une influence significative sur le statut de contamination du produit au risque  $\alpha < 0,06$ . Pour *L. spp.*, seul le statut de la zone « Affinage emballage » a une influence significative ( $p = 0,0003$ ), le statut de la zone « Fabrication Salage » n'étant significatif qu'au risque  $\alpha < 0,16$ . Les  $R^2$  ajustés sont 0,16 et 0,02, respectivement pour *L. monocytogenes* et *L. spp.*

**Tableau 13 Prévision du pourcentage d'analyses non conformes de produits finis P en fonction du statut mensuel de contamination des zones, pour *L. spp.* et pour *L. monocytogenes***

FS	AE	$P_{L. spp.} [IC_{95\%}] (\%)$	$P_{L. monocytogenes} [IC_{95\%}] (\%)$
0	0	0,09 [0,06 ; 0,16]	0,00 [0,00 ; 0,03]
1	0	0,13 [0,07 ; 0,25]	0,01 [0,00 ; 0,10]
0	1	0,29 [0,20 ; 0,42]	0,15 [0,07 ; 0,34]
1	1	0,40 [0,28 ; 0,59]	0,41 [0,21 ; 0,78]

La contamination de la zone « Affinage Emballage » implique un pourcentage plus élevé de produits finis contaminés en cours de production que la contamination de la zone « Fabrication salage ». Le pourcentage non nul de produits finis contaminés, malgré des statuts de contamination nuls pour les zones de l'environnement, s'explique par des contaminations non détectées dans l'environnement. Les pourcentages de produits contaminés sont plus élevés pour *L. spp.* que pour *L. monocytogenes*, notamment lorsqu'aucune zone de l'environnement n'est détectée contaminée. La non prise en compte de la zone « Autre » dans l'analyse et le fait que l'échantillonnage n'est pas assez performant pour détecter les produits contaminés par *L. monocytogenes* - une contamination par *L. monocytogenes* étant un événement plus rare qu'une contamination par *L. spp.* - peuvent être à l'origine de ces différences.

Le statut de contamination de la zone « Fabrication Salage » n'est pas significatif pour *L. spp.*, C'est un événement rare, le plus souvent couplé à la contamination de la zone « Affinage Emballage ».

De manière générale, cette analyse met en évidence l'impact de la contamination de la zone « Affinage Emballage » sur la proportion d'analyses produits non conformes, et par extrapolation, sur la proportion de produits finis contaminés, dont on obtient un ordre de grandeur. Cependant, les  $r^2$  ajustés des deux modèles sont faibles notamment, pour *L. spp.* ce qui peut être expliqué par la non prise en compte des catégories de prélèvements dans l'analyse. Le paragraphe suivant présente une étude visant à classer les catégories de prélèvements en fonction d'un risque pour la contamination du produit.

## **B. Influence des catégories de prélèvement et des éléments prélevés**

Nous avons dans un premier temps étudié l'influence de la catégorie de prélèvement contaminé sur le statut mensuel de contamination du produit, égal à 1 si au moins un produit a été détecté contaminé un mois donné, 0 sinon.

Pour limiter l'effet du biais lié au plan d'échantillonnage, nous avons considéré la variable « Présence / Absence » d'un ribotype au cours d'un mois donné et dans une zone de l'environnement donnée (« Fabrication Salage », « Affinage Emballage », « Autre »).

L'information sur le ribotype des souches détectées a été exploitée, permettant de tenir compte du suivi des souches dans l'environnement et les produits. Les données utilisées sont issues du fichier « Ribotype ».

Le nombre d'observations, pour un mois et une zone de l'environnement donnés, est égal au nombre de ribotypes détectés au cours de ce mois et dans cette zone. Les observations sont donc agrégées par mois, zone de l'environnement et ribotype.

Ainsi, pour un ribotype, une zone et un mois donnés, les variables suivantes sont considérées :

- Pour chaque catégorie de prélèvement, une variable indicatrice, du nom de la modalité correspondante (« machine », « milieu », « personnel », « matière première »), indique son statut mensuel de contamination.
- Une variable indicatrice « Produit » indique si au moins un produit fini a été détecté contaminé par le ribotype au cours de ce mois.

L'analyse ne tient pas compte des observations pour lesquelles le produit seul est contaminé, et non l'environnement. A l'instar de l'étude de l'influence des zones sur la contamination des produits, nous avons considéré que les trois sites étudiés n'en formaient qu'un. Les observations sont supposées indépendantes d'un mois et d'un ribotype à l'autre. De plus, le modèle suppose que si le statut de contamination du produit fini est égal à 1 pour deux zones de l'environnement différentes (pour un même ribotype et un même mois), au moins un produit a été contaminé au cours du passage dans chacune de ces deux zones. Cette hypothèse peut être justifiée par la non significativité de l'interaction des variables « Affinage Emballage » et « Fabrication Salage » de l'analyse précédente (cf. paragraphe III.A. de ce chapitre).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'influence de la catégorie de prélèvement contaminée sur la contamination du produit. Il est à noter le déséquilibre du plan d'échantillonnage : 134 observations présentent une contamination du « milieu », 70 observations une contamination d'une « machine », 6 observations une contamination du « personnel », et 6 observations une contamination de la « matière première ».

Les résultats de la régression logistique de la variable « Produit » sur les variables « machine », « milieu », « personnel », « matière première » et l'interaction des variables « machine » et « milieu » indiquent qu'elles sont toutes significatives au risque  $\alpha = 0,005$ , sauf la variable « personnel », ce qui confirme les observations de l'analyse descriptive du fichier « Ribotype ». Le  $R^2$  ajusté de ce modèle est de 0,52. Cette première approche a permis de sélectionner les catégories de prélèvements influençant de manière significative le risque de contamination des produits.

L'étude des facteurs de risque s'est dans un second temps concentrée sur l'impact d'une nouvelle variable à quatre modalités. Compte tenu du déséquilibre du plan d'échantillonnage et des résultats de l'analyse précédente, les modalités de cette nouvelle variable sont les suivantes (Tableau 14):

- contamination du milieu seul,
- contamination d'une machine seule,
- contamination d'une machine et du milieu simultanément,
- contamination de la matière première ou du personnel seuls.

**Tableau 14 Définitions des modalités de la nouvelle variable**

	Milieu	Machine	Matière première ou Personnel
Contamination du milieu seul	1	0	0
Contamination d'une machine seule	0	1	0
Contamination d'une machine et du milieu simultanément	1	1	0 ou 1
Contamination de la matière première ou du personnel seuls	0	0	1

L'occurrence des modalités de la variable « Produit » en fonction de l'occurrence des modalités de cette nouvelle variable est fournie dans le Tableau 15.

**Tableau 15 Occurrence des modalités 0 ou 1 de la variable « Produit » en fonction des modalités de la nouvelle variable et odds ratio correspondant**

Statut de contamination des différentes catégories			Fréquence d'observation d'un produit contaminé / Fréquence d'observation du statut	Odds-Ratio (Régression logistique)	
Milieu	Machine	Matières Premières ou Personnel		Référence = Machine	Référence = Milieu
1	0	0	11/104	0,19 [0,07 ; 0,15]	1
0	1	0	9/40	1	5,17 [1,19 ; 13,88]
1	1	0 ou 1	10/30	2,11 [0,78 ; 5,72]	10,96 [3,77 ; 31,89]
0	0	1	0/8	0,81 [0,13 ; 4,85]	4,23 [0,95 ; 18,75]

Une régression logistique de la variable « Produit » (statut de contamination mensuel du produit égal à 0 ou 1 pour un mois, un ribotype et une zone de l'environnement donnés) sur cette nouvelle variable et sur la variable « zone » montre qu'elles sont significatives au risque  $\alpha = 0,0001$  ( $R^2$  ajusté = 0,45). La prise en compte de l'interaction de ces variables indiquait une quasi complète séparation des données. Les risques relatifs entre

modalités pouvant être approchés par les odds ratio résultant de la régression logistique, les résultats mettent en évidence que si une machine seule est contaminée, le risque est 5,17 fois plus élevé que si seul le milieu est contaminé (Odds Ratio = OR = 5,17 [1,19 ; 13,88]) et 2,11 fois moins élevé que si milieu et machines sont contaminés simultanément (OR = 2,11 [0,78 ; 5,72]). Si la matière première ou le personnel est contaminé, le risque est 4,23 (OR = 4,23 [0,95 ; 18,75]) fois plus élevé que si le milieu seul est contaminé.

Concernant la variable « Zone », l'influence de la zone « Autre », pour laquelle l'information est ici disponible - grâce aux données concernant *L. spp.* -, est mise en évidence. Les résultats montrent que le risque de contamination du produit pour un mois donné et par un ribotype donné lorsque la zone « Autre » est contaminée est plus élevée que lorsque la zone « Affinage Emballage » est contaminée (OR<sub>Autre vs AE</sub> = 1,87 [0,71 ; 4,94]). Ces résultats mettent en évidence la capacité du personnel à véhiculer les microorganismes de l'environnement vers le produit. De plus, les souches retrouvées en zone « Fabrication Salage » ont une plus grande probabilité d'être isolées d'un produit que celles de la zone « Affinage Emballage » (OR<sub>FS vs AE</sub> = 13,98 [4,20 ; 46,56]). Ces résultats ne sont pas incompatibles avec les résultats de l'analyse sur l'influence des zones (cf. paragraphe III.A de ce chapitre). En effet, on évalue ici la probabilité d'isoler d'au moins un produit une souche isolée de la « zone Fabrication Salage », et non la proportion d'analyses non conforme de produits en cas de contamination de cette zone. Ce résultat indique que les souches isolées de la zone « Fabrication Salage » sont plus susceptibles de contaminer les produits que celle de la zone « Affinage Emballage ». Cependant, la zone « Fabrication Salage » contamine en moins grande proportion que la zone « Affinage Emballage ».

Une analyse du même type a été conduite afin d'exploiter l'information sur l'élément prélevé. Pour cela, les variables binaires « machine », « milieu », « personnel » et « matière première » ont été remplacées par d'autres variables binaires correspondant au statut de contamination (0 ou 1) de l'élément prélevé, dont les noms correspondent aux modalités de la variable « Élément ». Les variables sont les suivantes « bac », « batterie », « carton », « chariot », « chaussures », « coloration », « coupe », « égout », « emballeuse », « fonte », « lave », « mains », « mur », « pasteurisateur », « pile », « poignée », « porte », « retourne », « saumure », « sol », « sonde ». Les variables significatives au risque  $\alpha = 0,3$  sont : « batterie », « chariot », « égout », « emballeuse », « pasteurisateur », « pile », « sol », « saumure ». Parmi elles, les variables « emballeuse », « saumure », « chariot » et « sol » sont significatives au risque  $\alpha = 0,0005$ . Cependant la prudence est de mise lors de l'interprétation de ces résultats. En effet, les figures de l'annexe (paragraphe VI.B de ce chapitre) montrent que ces lieux de l'environnement sont parmi les plus analysés du fait de l'identification d'un réservoir de *Listeria*.

## IV. Discussion

Les résultats de l'analyse des données d'auto-contrôles des trois industries laitières se déclinent sur plusieurs niveaux :

- des phénomènes connus concernant la présence de *Listeria* dans l'environnement fromager, et des phénomènes moins connus,
- le risque d'implantation de *Listeria* dans l'environnement et son taux de renouvellement,
- l'adéquation entre environnement et produit en fonction des étapes et de l'échelle de temps,
- les facteurs de risque de contamination des produits en cours de production,
- l'intérêt des données d'auto-contrôles et de typage génétique dans un cadre d'investigation et/ou de prévision,
- des informations relatives à la construction d'un modèle d'appréciation du risque.

Tout d'abord, la visualisation graphique des historiques des pourcentages d'analyses positives dans l'environnement et dans les produits a conduit à l'hypothèse d'existence de deux scénarios *a priori* pour la dynamique temporelle de contamination de l'environnement : le premier scénario est la survenue accidentelle de *Listeria*, suivie de son implantation dans l'environnement ; le deuxième est la présence de *Listeria* sous forme d'écosystème régulier ou de bruit de fond. Cependant, l'évolution du pourcentage d'analyses non conformes dans l'environnement ne peut se faire en ignorant que la détection d'une souche engendre une augmentation du nombre d'analyses, ce qui met en doute la vraisemblance des courbes. Bien que l'approche qualitative (présence/absence) ait permis de s'affranchir de ce biais, elle n'a pas permis de confirmer ou infirmer cette hypothèse de deux scénarios distincts.

Pourtant, les résultats du Tableau 10 montrent que les ateliers des différents sites présentent des comportements similaires en termes d'indicateurs. Par ailleurs, l'hypothèse d'indépendance entre la présence des coliformes dans le produit et celle de *Listeria* n'a pas été rejetée. Or, les coliformes étant considérés comme un indicateur de l'application des bonnes pratiques d'hygiène au sein des industries laitières (Kanbakan et al., 2004; Yucel and Ulusoy, 2006), bien que de moins en moins (Hutchison et al., 2005), on peut conclure que la présence de *Listeria* n'est pas liée à un problème d'hygiène général. Ces deux observations contredisent l'hypothèse d'une dynamique de contamination sous forme de bruit de fond et appuient celle du scénario d'introduction accidentelle de *Listeria* suivie de son implantation dans l'environnement. Enfin, couplé au fait que les zones de l'environnement et les catégories de prélèvement sont des variables significatives dans l'étude des facteurs de risque de contamination des produits, nous appuyons l'hypothèse d'une pression de contamination s'exerçant de manière similaire d'un site à l'autre, mais dépendant, évidemment, de l'agencement de chacun, des mesures de maîtrise et des flux mises en place, etc.

Ensuite, l'étude du suivi épidémiologique des souches par l'intermédiaire des indicateurs a confirmé le rôle majeur des ateliers d'affinage et d'emballage dans le risque de contamination des produits en cours de production. D'une part, les environnements de ces ateliers sont les plus susceptibles d'héberger des souches persistantes de *Listeria* dans l'environnement (Nelson, 1990; Pak et al., 2002). En effet, les conditions environnementales physico-chimiques sont favorables à la croissance de *Listeria* qui présente de plus de grandes capacités d'adaptation à des conditions environnementales extrêmes. Ainsi, suite à l'introduction d'une souche persistante dans l'environnement de ces ateliers, les mesures d'hygiène quotidiennes permettent difficilement son éradication. D'autre part, ils représentent les zones de l'environnement avec le plus fort taux d'adéquation environnement produit, d'après la relation mise en évidence entre ce dernier et la diversité génétique.

L'étude a montré que l'atelier de fabrication, où la température est élevée, présente un taux de renouvellement important, mais est moins favorable à l'implantation de souches que les autres ateliers. Sa diversité génétique, couplée à celles des ateliers de traitement et de salage, fournit pour cette zone un faible taux d'adéquation environnement produit. Pourtant, les résultats de l'étude des facteurs de risque de contamination montre qu'une souche détectée un mois donné en zone « Fabrication Salage » a environ 14 fois plus de chance d'être détectée dans un produit le même mois. Ces résultats *a priori* contradictoires illustrent le fait qu'une contamination de la zone « Fabrication Salage » a des répercussions immédiates sur le produit par rapport à une contamination de la zone « Affinage Emballage », dont l'impact s'évalue sur de plus longues périodes. En effet, le taux d'adéquation Environnement / Produit est calculé sur une échelle annuelle, alors que les rapports de cotes issues de la régression logistique sont à l'échelle mensuelle. De plus, l'étude des facteurs de risque met en évidence que la zone « Affinage Emballage » contamine une plus grande proportion de produits que la zone « Fabrication Salage », caractérisée par un taux de renouvellement plus élevé que la zone « Affinage Emballage ».

Ainsi, on peut conclure que les souches persistantes, isolées d'« Affinage Emballage » contaminent les produits pendant de longues périodes, alors que les souches de la zone « Fabrication Salage » contaminent les produits, sur de courtes périodes, et en plus faible proportion.

L'observation de souches persistantes, c'est-à-dire fréquemment isolées de certains environnement industriels, conduit à s'interroger sur l'inhérence de ce caractère (Lappi et al., 2004; Lunden et al., 2003b; Tompkin, 2002). Concernant *L. monocytogenes*, une étude montre que des cellules de cette espèce, fréquemment isolées d'environnements industriels, sont caractérisées par la production de monocine E, la présence de plasmide et la résistance au cadmium (Harvey and Gilmour, 2001). Ces caractéristiques leur conféreraient un avantage pour persister dans l'environnement. Cependant, il n'est pas démontré que ces caractéristiques sont intrinsèques aux souches ; elles peuvent avoir été acquises en conséquence de l'adaptation des souches à l'environnement, hypothèse que nous appuyons suite aux résultats de l'analyse des données, n'ayant pas mis en évidence de

ribotypes persistants communs aux sites étudiés. Ces résultats sont confirmés par (Lunden et al., 2000) qui tentent de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre le caractère persistant des souches dans leur environnement et leur capacité d'adhésion, à partir de souches de *L. monocytogenes* isolées d'ateliers de transformation alimentaire avec une fréquence plus ou moins grande. Les résultats montrent qu'après 1 ou 2 heures de temps de contact, les souches persistantes adhèrent mieux que les souches sporadiques, mais qu'après 72 heures, la différence entre les deux types de souches n'est plus aussi marquée.

Concernant l'étude de l'influence des catégories de prélèvement (machine, milieu, personnel, matière première), les résultats confirment des résultats connus (les surfaces qui ne sont pas en contact avec le produit présente moins de risque que celles qui le sont, et ces dernières présentent elles-mêmes moins de risque que si toutes les surfaces sont contaminées) mais apportent une classification des trois types de situations grâce aux rapports de cotes. Il est à noter que le passage du milieu contaminé aux machines contaminées présente presque trois fois plus de risque que le passage des machines contaminées à l'ensemble des surfaces contaminées, ce qui met en évidence le caractère déterminant des surfaces en contact avec le produit en termes de risque de contamination des produits en cours de production.

Parmi les résultats de l'étude sur l'influence des éléments prélevés, on peut constater que la variable « égout » n'est pas retenue par le modèle de régression logistique, en dépit des publications évoquant leur impact sur le risque de contamination secondaire des produits (Kells and Gilmour, 2004). L'impact supposé de la contamination des égouts sur la contamination des produits est attribué au fait qu'ils peuvent abriter des réservoirs de *L. monocytogenes* et que les mesures d'hygiène permettent la dissémination des cellules le constituant dans l'environnement (Holah et al., 1993; Spurlock and Zottola, 1991). Cependant, ils ne sont pas une source directe de contamination des produits mais ont plutôt un rôle d'alimentation du milieu de l'environnement. Par contre, la significativité de la variable « saumure », en adéquation avec la significativité de la variable « matière première », confirme des résultats publiés dans la littérature (De Santis et al., 2004; Larson et al., 1999).

La non significativité de la variable « personnel » est attribuable au fait que peu de prélèvements sont effectués directement sur le personnel. Par contre, la significativité de la zone « Autre » peut être reliée à la capacité du personnel à véhiculer les microorganismes depuis des zones contaminées (mais où les produits ne sont pas exposés) vers les produits. Cela met en évidence l'importance des ruptures hygiéniques et de la maîtrise des flux pour prévenir la dissémination d'une contamination (Pritchard et al., 1995). De plus, la non prise en compte de cette variable dans le modèle de prévision de la proportion de produits contaminés peut expliquer son faible  $R^2$  ajusté. Cependant, ces résultats sont à manipuler avec précaution étant donné le très faible nombre d'observations par rapport au nombre de variables et étant donné les importants biais d'échantillonnage.



En conclusion, il semble, au vu des données propres à chaque site, qu'il n'existe pas un comportement propre aux sites, mais que la pression de contamination de l'environnement s'exerce différemment en fonction des endroits de l'environnement contaminés. La contamination d'un endroit de l'environnement est plus ou moins fréquente (impliquant des expositions différentes) et plus ou moins grave (impliquant des impacts différents) ; les résultats des plans de contrôle doivent être traités différemment selon les cas.

## V. Recommandations

On peut retirer de l'étude de ces données des recommandations concernant la collecte des données d'auto-contrôles dans l'industrie agro alimentaire. En effet, ces données sont les seules informations permettant de connaître le statut de contamination de l'environnement par des bactéries pathogènes et la pertinence du plan de contrôle, tant en termes de points de prélèvement que de fréquence de mise en œuvre, est essentielle pour assurer la représentativité de cette contamination de l'environnement. Il est à noter que la sensibilité et la spécificité des tests microbiologiques, agrandissent encore l'incertitude sur les données (Gardner, 2004).

Dans un premier temps, un plan de contrôle stable permettrait de détecter des valeurs anormales selon des critères définis au préalable (Murphy and Seward, 2004). Dans un second temps, bien que les données de prévalence n'aient pas pu être utilisées, du fait de biais de sélection lors des prélèvements dans l'environnement, l'approche qualitative adoptée, considérant le statut mensuel de contamination d'un élément, a montré la possible exploitation statistique de telles données, mettant en évidence des résultats tels que l'identification et le classement des facteurs de risque, ou des conclusions quant à l'implantation de *Listeria* dans l'environnement. Ainsi, avec un plan d'échantillonnage non biaisé, couplé aux données sur le suivi épidémiologique des souches, des analyses à visée prévisionnelle sont envisageables. De telles tentatives d'analyses de données issues de plans de contrôles environnementaux existent (Pak et al., 2002), mais restent le plus souvent descriptives (Autio et al., 1999; Kells and Gilmour, 2004; Rorvik, 1995).

Comme nous l'avons vu, ces données d'auto-contrôles sont collectées dans un objectif d'investigation et de vérification de l'efficacité des mesures d'hygiène. Le couplage de ces objectifs à celui d'analyses statistiques des données implique la constitution de trois fichiers : l'un contenant uniquement les résultats des prélèvements dont le lieu devrait être aléatoire et le nombre stable, l'autre contenant les mêmes données, ainsi que les résultats des prélèvements supplémentaires. Le troisième fichier répertorie les ribotypes des souches isolées, permettant la traçabilité des cellules contaminantes.

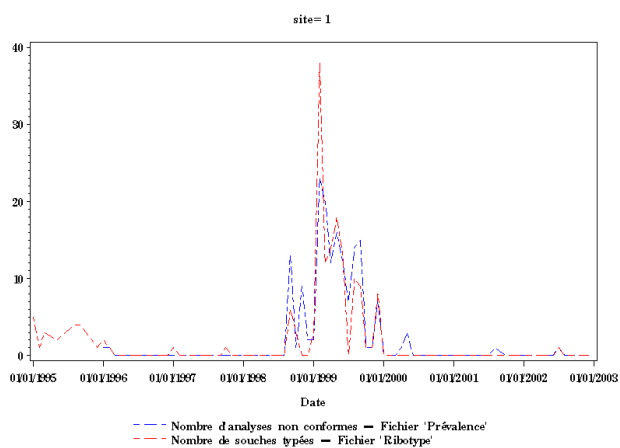
Cependant, dans le cadre d'événements rares tels que la contamination de l'environnement par *L. monocytogenes*, le choix du plan d'échantillonnage reste difficile. En effet, l'observation de pourcentages d'analyses nuls pour l'environnement et les produits ne permettent pas de conclure à l'absence de contamination. De plus, la valeur du taux d'adéquation Environnement/Produit, nul dans presque 50% des cas, laisse penser que la contamination des produits n'est pas détectée, du fait de plans d'échantillonnage inefficaces. Dans ce contexte,

l'utilisation d'un modèle d'appréciation de l'exposition stochastique représenterait un apport en termes d'optimisation des plans d'échantillonnage, comme nous le verrons dans les chapitres suivants.

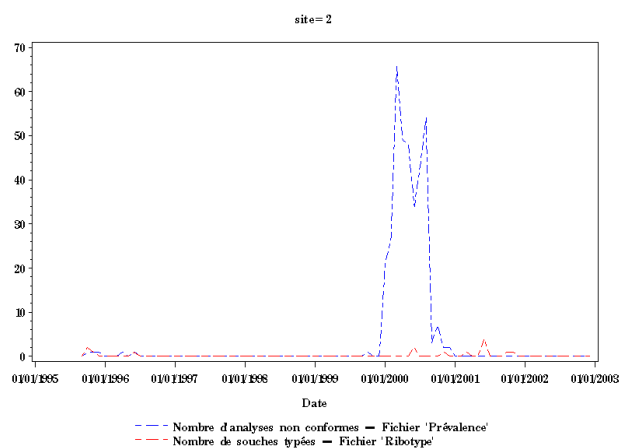
## **VI. Annexe**

### **A. Qualité des données**

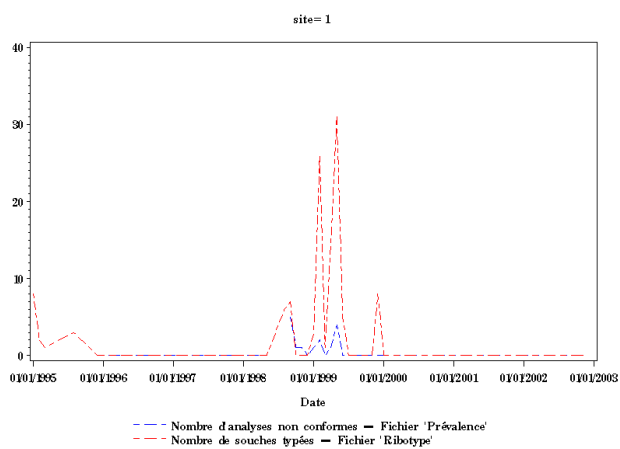
Considérant uniquement les ribotypes des produits pour lesquels le fichier « prévalence » est disponible, les figures ci-dessous (Figure 6 à Figure 13) comparent le nombre d'analyses non conformes du fichier « Prévalence » et le nombre de souches typées et répertoriées dans le fichier « Ribotype ». Le nombre d'analyses non conformes des produits et le nombre total d'analyses non conformes de l'environnement (toutes zones confondues) sont prises en compte pour le fichier « Prévalence ». De la même manière, le nombre d'observations du fichier « Ribotype » de l'environnement et des produits, tous ateliers confondus, sont pris en compte. Le même type de comparaison est proposé (Figure 12, Figure 13) pour l'ensemble des souches de *Listeria* provenant du site 2 (*L. monocytogenes* et *L. spp.*), typées et répertoriées dans le fichier « ribotype », et le nombre d'analyses non conformes pour *L. spp.*, répertorié dans le fichier « Prévalence ».



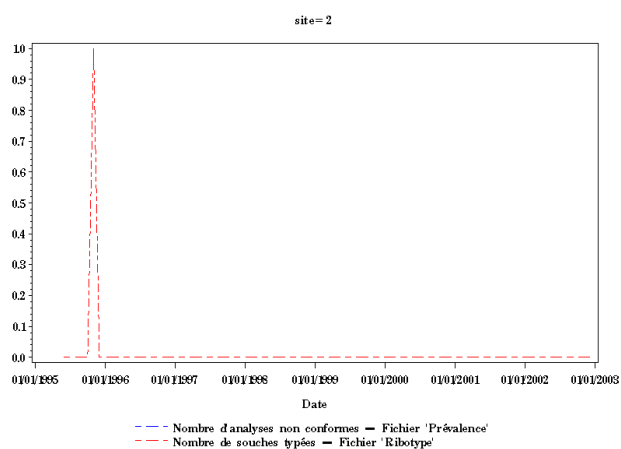
**Figure 6 Environnement Site 1 - *L. monocytogenes***



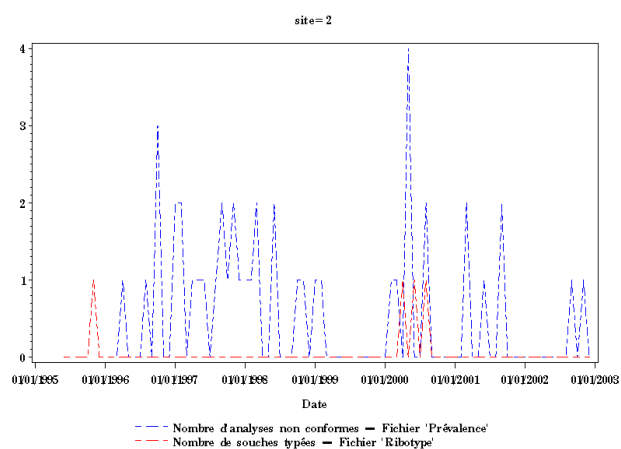
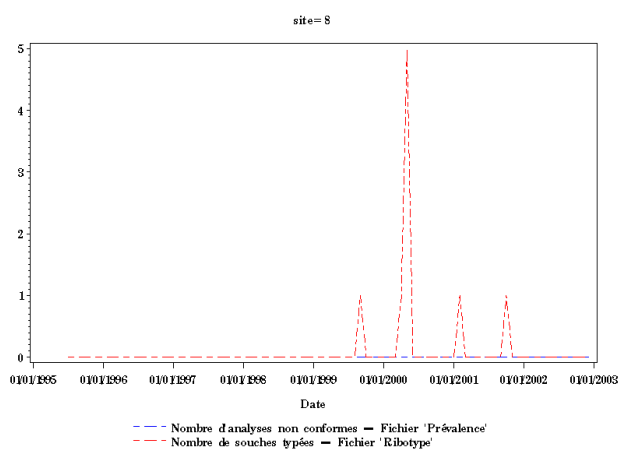
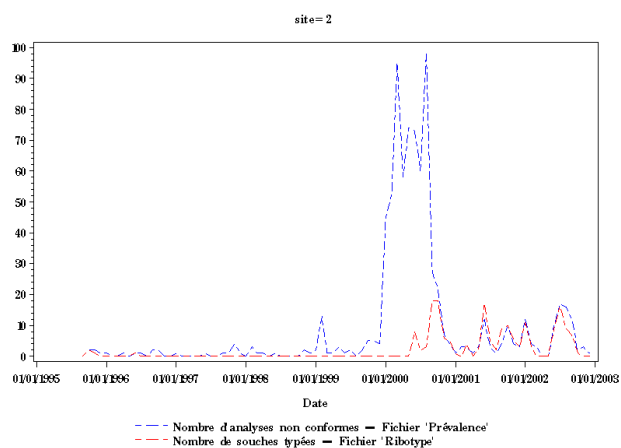
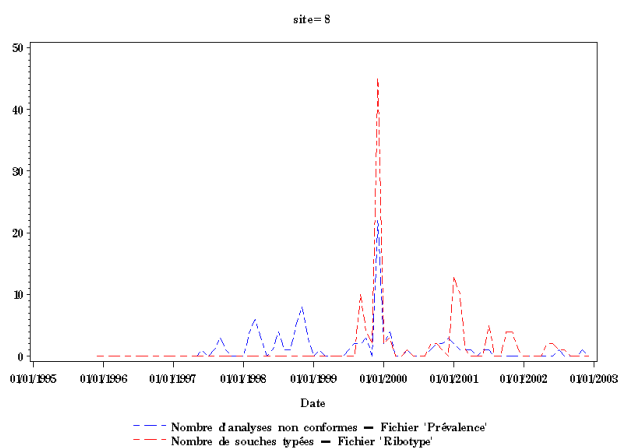
**Figure 8 Environnement Site 2 - *L. monocytogenes***



**Figure 7 Produit 1-1 - *L. monocytogenes***



**Figure 9 Produit 2-1 - *L. monocytogenes***



## B. Répartition des prélèvements de l'environnement selon l'atelier, la catégorie de prélèvement et l'élément prélevé

Les histogrammes de la Figure 14 à la Figure 16 ci-dessous fournissent le nombre d'observations du fichier « Ribotype » par Atelier, par Catégorie de prélèvement et par élément prélevé. Les catégories 1 à 4 sont respectivement le milieu, les machines, les matières premières et le personnel.

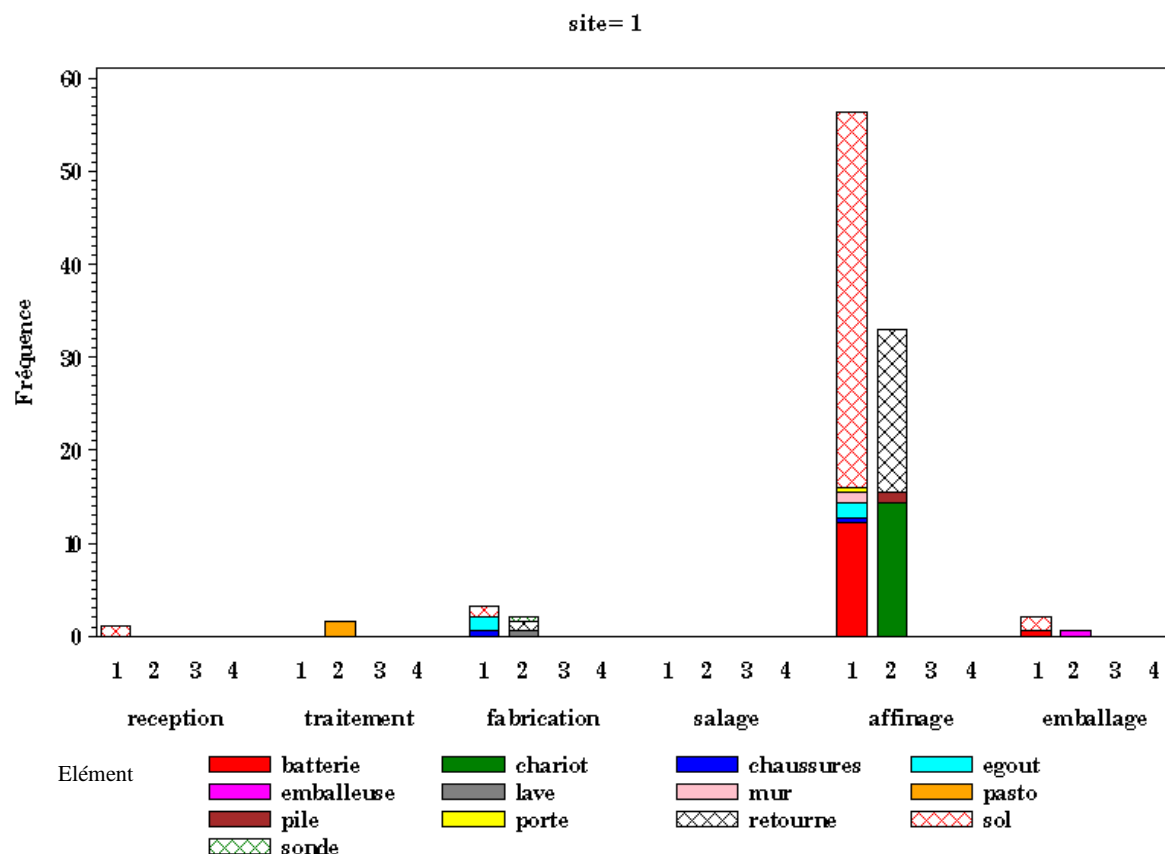


Figure 14 Répartition des prélèvements selon les variables « Atelier », « Catégorie » et « Élément » - Site 1

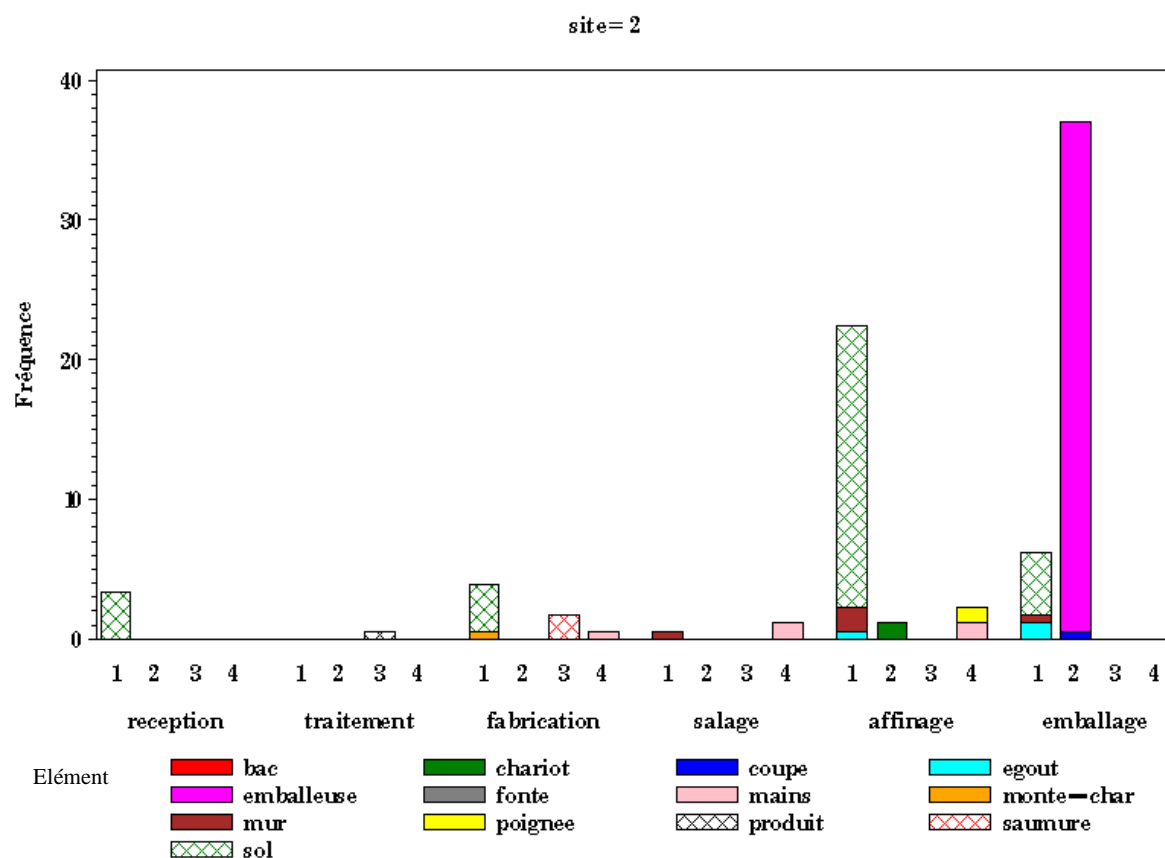


Figure 15 Répartition des prélèvements selon les variables « Atelier », « Catégorie » et « Élément » - Site 2

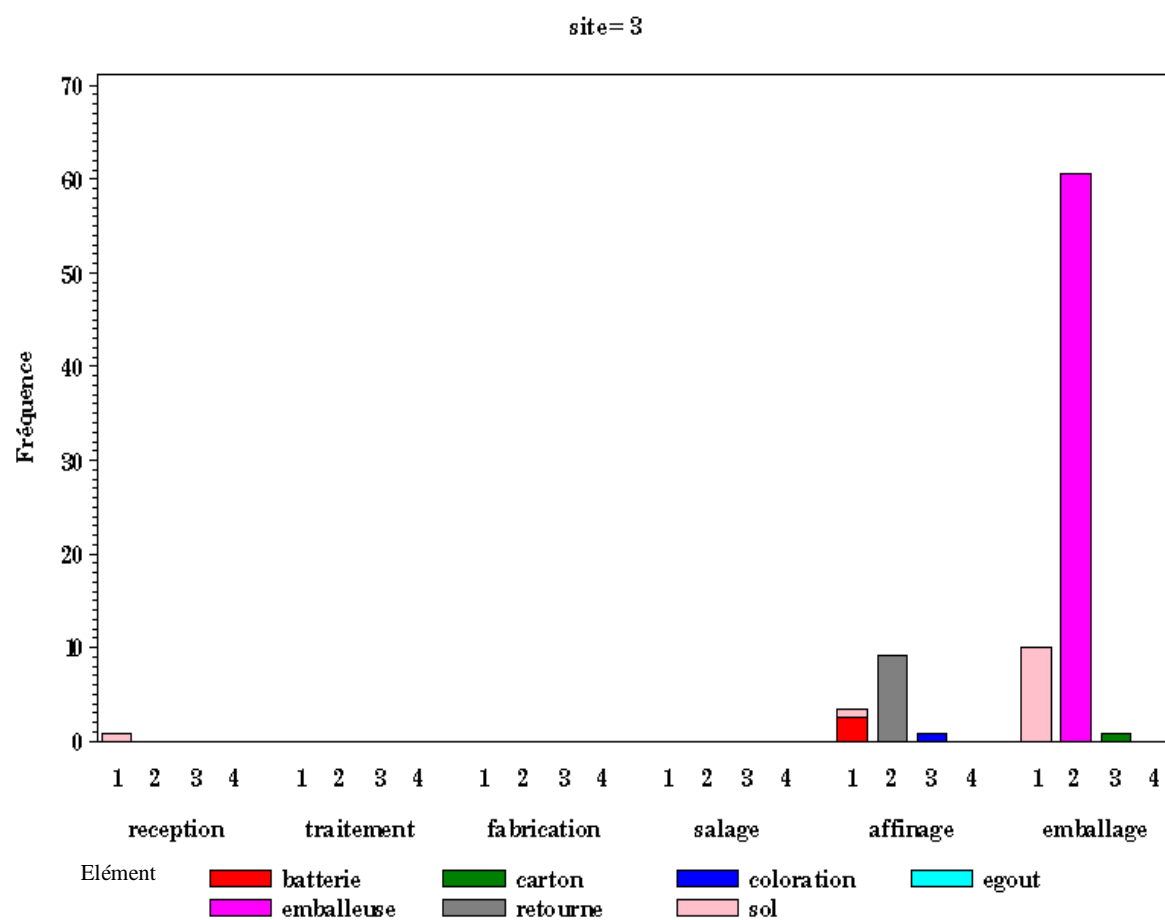


Figure 16 Répartition des prélèvements selon les variables « Atelier », « Catégorie » et « Elément » - Site 3

### C. Evolution de la diversité génétique (d) et du taux de renouvellement (r) au cours du temps et par site

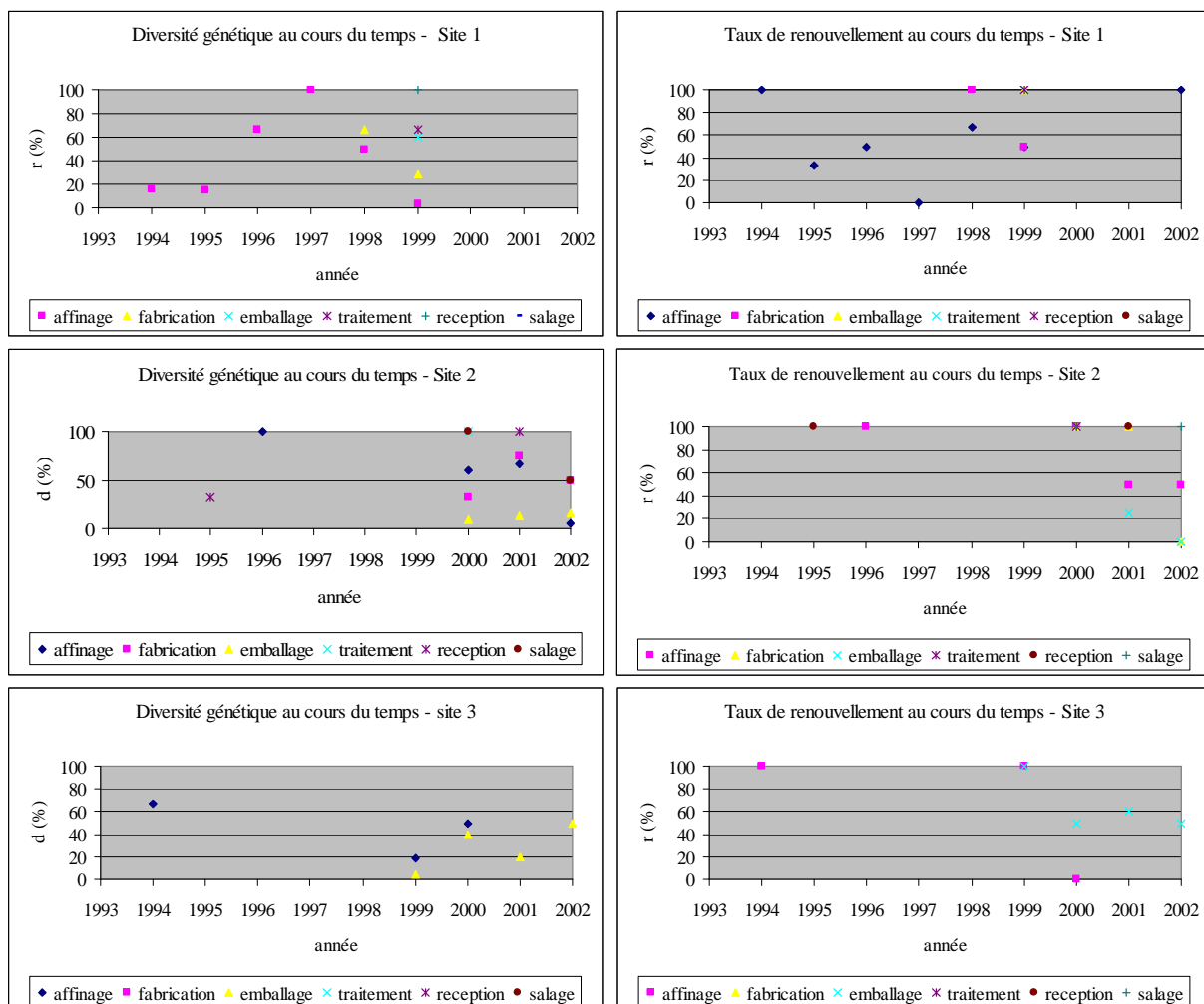


Figure 17 Evolution de la diversité génétique (d) et du taux de renouvellement (r) au cours du temps et par site





# CHAPITRE III

## Evolution des Charges Microbiennes en Industrie Agroalimentaire : Revue Bibliographique et Stratégie de modélisation

La dynamique de la contamination microbienne d'une usine agroalimentaire et des produits qu'elle contient est un système complexe qui résulte de l'interaction de multiples phénomènes se développant sur différentes échelles de temps et d'espace. Deux types de phénomènes sont à l'origine de l'évolution des charges microbiennes dans l'environnement et les matrices alimentaires : le premier, dit de contamination secondaire, est relatif aux transferts des microorganismes engendrés par des contacts ; le deuxième est relatif au comportement microbien lié aux conditions physico-chimiques environnementales.

La prise en compte des transferts de microorganismes dans les modèles d'appréciation quantitative des risques microbiologiques reste relativement rare. Pourtant, l'une des principales conséquences de tels phénomènes est l'augmentation de la prévalence de produits contaminés en cours de production, ce qui ne peut être négligé dans l'estimation du risque. Par contre, le deuxième type de phénomène est le plus souvent pris en compte dans les modèles d'appréciation quantitative du risque et, en termes de modélisation, fait l'objet d'un sujet de recherche à part entière, la *microbiologie prévisionnelle*, qui a connu un essor important depuis le début des années 80 (cf. Chapitre I). L'intégration de ce type de phénomènes permet l'estimation de la concentration en microorganismes pathogènes dans les produits.

Les résultats de l'appréciation de l'exposition se traduisant par l'estimation de la prévalence et de la concentration en microorganismes indésirables, l'intégration simultanée de ces deux types de phénomènes dans un modèle est indispensable.

L'objectif de ce chapitre est de proposer une approche permettant de modéliser simultanément les transferts des microorganismes et le comportement microbien. A l'instar de Nauta (Nauta, 2001), nous répertorions, selon la classification ci-dessus, les différents phénomènes susceptibles d'influencer la fréquence et le niveau de contamination des unités de production à chaque étape du procédé de fabrication, et, en grande partie, relatifs à la contamination des surfaces. Pour chacun d'eux nous proposons une revue bibliographique du point de vue microbiologique, puis explorons l'état d'avancement d'intégration de ces phénomènes dans des modèles d'appréciation du risque, une attention particulière étant portée à la bactérie pathogène *L. monocytogenes*. Nous mettons en évidence les difficultés relatives à l'intégration simultanée des différents modèles dans une appréciation quantitative du risque, pour finalement proposer une approche méthodologique permettant cette intégration.

## **I. Evolution des charges microbiennes liée au transfert de microorganismes**

### **A. Les phénomènes de contaminations secondaires et les modèles associés**

Dans le Chapitre II, nous avons mis en évidence le rôle joué par l'environnement dans la propagation d'une contamination. Notamment, en fonction des types de lieux et des zones de l'environnement contaminés, les scénarios de dispersion d'une contamination dans l'environnement et son impact sur les produits diffèrent. Les résultats ont aussi permis de quantifier les conséquences respectives d'une contamination des surfaces en contact avec le produit (machine) ou non (milieu). C'est sur cette distinction machine / milieu que l'identification des phénomènes relatifs aux contaminations secondaires des produits s'est basée.

Ces phénomènes impliquent un ou plusieurs *compartiments*. Un compartiment peut être une unité de production ou un ensemble d'unités de production, ou composé de surfaces de l'environnement. Ces dernières se divisent elles-mêmes en deux catégories : les surfaces des *machines*, en contact direct ou rapproché avec les produits en cours de traitement, et les surfaces du *milieu*, qui ne sont pas en contact direct avec les produits, telles que le sol ou les murs, par exemple.

Nous distinguons deux processus de contamination des produits en cours de fabrication, dépendants des compartiments impliqués dans une étape donnée et de leur niveau de contamination initial :

- Si des surfaces de produits sont contaminées, elles peuvent, par contact direct (par exemple, lors du transport de bovins dans un même camion) ou indirect (à l'aide d'un vecteur, une machine ou un opérateur, par exemple), contaminer les surfaces d'autres produits. Dans ce cas, nous parlerons de *contamination croisée*.
- Si des surfaces de l'environnement sont contaminées, des microorganismes peuvent être transférés de manière *accidentelle* à la surface des produits. Dans ce cas, nous parlerons de *recontamination*. Nous nous intéressons ici à la contamination de produits solides par l'environnement et non à la contamination de produits liquides par l'environnement (passage d'un liquide dans un conduit contaminé par exemple). Si la surface d'une machine est contaminée, la contamination du produit résulte d'un contact direct (ou rapproché) ; sinon, elle se produit par l'intermédiaire d'un vecteur tel que les aérosols, ou le personnel.

Ces deux termes, *recontamination* et *contamination croisée*, sont massivement utilisés dans la littérature, mais de manière interchangeable et sans véritable distinction. A notre connaissance, une seule référence distingue ces deux notions lors d'une étude sur la prévalence de la contamination des carcasses de porcs par (Alban and Stark, 2005) : la recontamination correspond à la contamination des carcasses de porcs par les fèces des animaux et la contamination croisée correspond à la contamination entre animaux par l'intermédiaire des fèces.

Chacun de ces deux phénomènes possède pourtant ses propres caractéristiques:

- La recontamination est un phénomène qu'il est possible de limiter, notamment, grâce à la mise en place de mesures d'hygiène visant à éliminer les bactéries présentes dans l'environnement. Par contre, en cas de contamination des produits, la contamination croisée est difficilement évitable. Seules des mesures antérieures à l'étape le permettraient, telles qu'une étape de réduction de la population microbienne sur le produit lui-même (application d'un bactéricide, par exemple) ou la détection des produits contaminés avant traitement (Evers, 2004; Jordan et al., 1999a).
- Un autre caractère distinguant ces deux phénomènes est l'ampleur des conséquences au niveau spatio-temporel : la recontamination à partir d'une source de l'environnement peut concerner plusieurs lots de produits successifs, correspondant à une contamination inter-lot et s'inscrivant dans la durée, alors que la contamination croisée se produit entre les unités de production d'un même lot et correspond à une contamination intra-lot, ponctuelle.

Malgré ces différences, ces deux phénomènes ne doivent pas être considérés indépendants, puisque l'un peut être à l'origine de l'autre.

## 1) La recontamination

Les catégories de l'environnement d'une usine susceptibles d'être contaminées sont: le *milieu*, le *personnel*, les *matières premières* (intrants, additifs, matières consommables), les *machines* ou une combinaison de ces catégories (cf. Chapitre II).

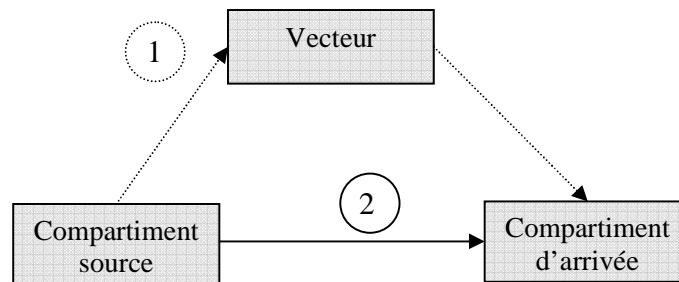
Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la présence de microorganismes pathogènes dans ces lieux mais nous ne nous intéressons pas à la cause de cette présence supposant qu'elle n'a pas d'influence sur le mécanisme de recontamination. De plus, nous ne tiendrons pas compte des recontaminations par le personnel ou par la matière première, le personnel représentant le plus souvent un vecteur et la contamination des matières premières (les cartons d'emballage, par exemple) restant un événement rare (cf. Chapitre II).

Supposons qu'une de ces catégories de l'environnement est contaminée. La recontamination correspond au transfert des bactéries de ce lieu vers la surface des produits, par contact (recontamination par une machine) ou par l'intermédiaire d'un vecteur (recontamination par le milieu) (Reij et al., 2004).

Dans le cas d'une contamination du milieu, les vecteurs peuvent être les aérosols générés par les opérations de nettoyage (Holah et al., 1993; Mettler and Carpentier, 1998; Prendergast et al., 2004; Spurlock and Zottola, 1991). En effet, les jets sous pression peuvent disséminer des microorganismes issus de réservoirs isolés (les égouts, par exemple) et provoquer la contamination des produits (Rørvik et al., 1997), en produisant des gouttelettes dans l'air de plus ou moins grandes tailles (Burfoot et al., 2003). Les microorganismes adhérant à la poussière dont l'activité humaine et le mouvement des machines engendre la dispersion (Kang and Frank, 1989b), ou la présence d'insectes (De Jesus et al., 2004), peuvent aussi être à l'origine de la contamination des produits. Par contre, le risque de contamination par l'air semble moindre pour *L. monocytogenes* (Kang and Frank, 1989a). En effet, (Autio et al., 1999) constatent lors d'une étude d'investigation dans une usine de saumon fumé, que malgré une contamination importante de l'environnement par *L. monocytogenes*, aucun échantillon d'air, parmi 125 prélèvements, n'était contaminé. Le personnel, en cas d'hygiène déficiente, peut aussi jouer le rôle de vecteur entre un réservoir de l'environnement et les produits, bien que ce type de recontamination soit plus probable aux étapes suivant la production telle que la préparation avant la consommation (Chen et al., 2001; Kusumaningrum et al., 2004; Montville et al., 2001).

Dans le cas d'une contamination de la machine, la source de microorganismes se trouve sur une ou plusieurs surfaces de la machine et le contact entre les surfaces et les produits, direct ou indirect, induit la recontamination (Midelet and Carpentier, 2002; Pérez et al., 2004b). Ces réservoirs se situent notamment dans des zones de la machine difficilement accessibles aux mesures d'hygiène (Gill et al., 1999).

Quelques modèles, communément appelés mécanistiques, c'est-à-dire dont les paramètres ont un sens physique, existent. Ces modèles se basent sur le schéma suivant : un compartiment-source contaminé par des bactéries pathogènes transfère des bactéries dans un autre compartiment, par l'intermédiaire d'un vecteur ou non (den Aantrekker et al., 2003a). Le compartiment source représente généralement une partie de l'environnement (machine ou milieu) et le compartiment d'arrivée représente généralement une unité de production (Figure 18).



**Figure 18 (1) Recontamination par une machine, (2) Recontamination par le milieu**

La forme de ces modèles et le sens physique des paramètres dépendent du procédé considéré et des objectifs de la modélisation. Plusieurs cas de figure se présentent, dépendant des conditions suivantes :

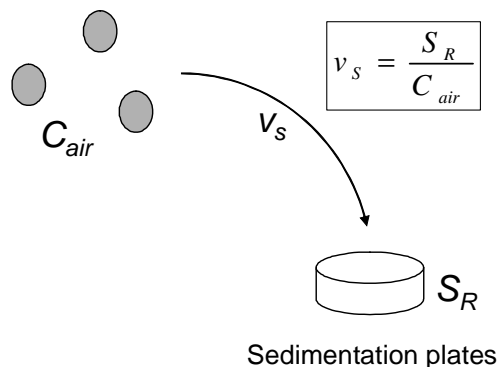
- Si la source de contamination est connue (1)
- Si le niveau de contamination de la source reste stable au cours du temps (2)
- Si la probabilité de contamination d'une unité de production est connue (3)

Toutes les combinaisons n'ont pas été explorées en termes de modélisation. Nous décrivons ci-après pour les combinaisons existantes, les modèles associés.

(1) Lorsque la source de contamination est inconnue, deux possibilités existent : soit la source est l'environnement lui-même auquel cas on est dans le contexte de la recontamination; soit la source est une unité de production auquel cas, on est dans le contexte de la contamination croisée. (van Gerwen and Gorris, 2004) propose un modèle de recontamination sans préciser la source de contamination. Cependant, l'étude détaillée de ce modèle suggère que le compartiment-source est une partie de l'environnement. Nous reviendrons sur cette étude.

(2) Dans le cadre d'un compartiment-source représentant l'environnement, soit le niveau de contamination de la source de contamination varie au fur et à mesure du passage des unités de production, soit ce niveau reste constant. Dans le dernier cas, le nombre de bactéries transférées à l'unité de production est fixe et le modèle consiste en une équation simple reliant les différentes variables d'intérêt. Par exemple, la

recontamination des produits par l'air est modélisée par une équation reliant la concentration dans l'air en microorganismes  $C_{air}$ , le flux de sédimentation  $S_R$ , et la vitesse des particules d'air contenant ces bactéries  $v_s$  (den Aantrekker et al., 2003b) (Figure 19).



**Figure 19 Exemple de modélisation de la contamination par l'air (Source : (den Aantrekker et al., 2003b))**

Ce type de modèle peut être intégré dans un modèle général de la chaîne de fabrication dans laquelle différents procédés se succèdent. La prévalence de contamination des produits à l'étape  $k$  de la chaîne est indépendante de celle à l'étape  $k-1$  et la concentration des produits (ou des ensembles de produits) est indépendante de la prévalence.

Dans le cas où le niveau de contamination du compartiment-source varie au fur et à mesure du passage des unités de production, le recours à des systèmes dynamiques est courant. Leur solution analytique, si elle existe, permet l'estimation des paramètres du modèle par ajustement des équations sur des données expérimentales. Si le temps est continu, des *systèmes d'équations différentielles* sont utilisés, comme par exemple dans le cas de la recontamination d'un liquide par un biofilm situé dans un tuyau. (den Aantrekker, 2003) simulent l'évolution de la concentration en microorganismes dans le liquide et sur la surface d'une canalisation au cours du temps, en tenant compte des transferts de microorganismes entre les deux compartiments (liquide et surface) et de leur croissance. Si le temps est discret, on a recours à des *systèmes d'équations aux différences*, tel que dans une étude du FSIS (Food Safety and Inspection Service) modélisant la recontamination de produits par une machine, l'unité de production (et donc l'unité de temps du système dynamique discret) étant le lot de produit (Gallagher et al., 2003). Dans ce modèle, un réservoir de bactéries de l'environnement de l'usine alimentaire, en bactéries, quotidiennement et selon un certain niveau de concentration surfacique (en CFU/cm<sup>2</sup>), les surfaces en contact avec les produits. Ces dernières constituent alors le compartiment-source, en transférant une proportion  $p$  de bactéries vers les produits du lot. Le niveau de contamination du compartiment-source est recalculé après chaque transfert, en tenant compte de la fréquence et de l'efficacité des mesures d'hygiène ; le processus recommence au passage du lot suivant. Dans cet exemple, le résultat final correspond au nombre total de cellules par lot.

(3) Les modèles décrits ci-dessus permettent d'estimer le niveau de contamination des différents compartiments, en supposant que le compartiment-source, lorsqu'il est contaminé, contamine les produits selon une proportion de microorganismes transférés, dans le cas continu comme dans le cas discret. Certaines études visent aussi à modéliser la prévalence de produits ou des lots de produits contaminés, en supposant que la recontamination n'est pas systématique. Dans ce cas, les paramètres de transfert sont d'une autre nature. Ainsi, (van Gerwen and Gorris, 2004) calcule l'évolution de la prévalence de produits contaminés au cours d'une étape à l'aide d'une probabilité de recontamination des produits : Si la prévalence des produits contaminés est  $p$  à l'entrée du lot de l'étape  $k$  et la probabilité de recontamination est  $p_r$  au cours de cette étape, la probabilité pour un produit d'être contaminé à la sortie de l'étape  $k$  est  $1 - (1 - p_r)(1 - p)$  (Figure 20). Le nombre de bactéries contaminantes est indépendant de cette probabilité de recontamination.

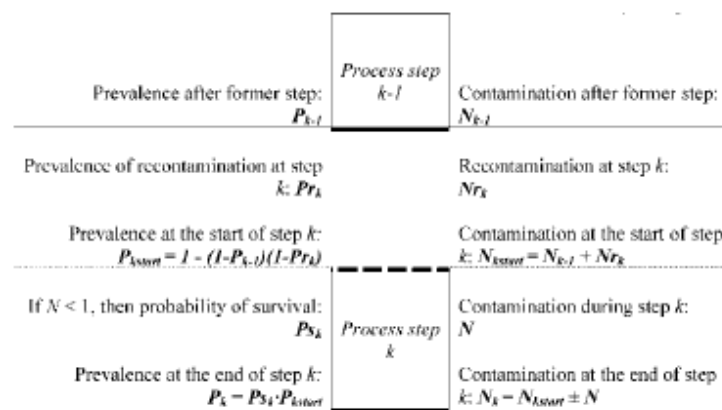


FIGURE 6. Schematic representation of parameters used by the MIRACLE approach in exposure calculations with regard to re-contamination.

**Figure 20 Exemple de modélisation de la recontamination au cours du procédé (Source : (van Gerwen and Gorris, 2004))**

Dans ce modèle, les variables d'entrée et de sortie de l'étape sont la prévalence des produits intra-lot et leur niveau de contamination. Le niveau de contamination de la source reste constant au cours du temps, mais il est possible de faire varier ce dernier. Ainsi, (Sauli et al., 2004) considère une probabilité de contamination de la source.

Dans le cas du modèle du FSIS, la prévalence inter-lot dépend de la fréquence et de la durée de contamination du compartiment-source, estimées au préalable.

## 2) Contamination croisée

La contamination croisée peut survenir lorsque les produits d'un même lot s'inter-contaminent: un ou plusieurs produits initialement contaminés contaminent d'autres produits par contact direct ou indirect. Dans

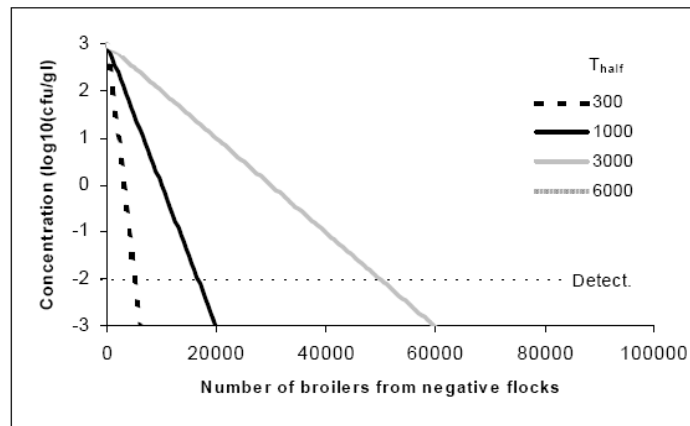


le cadre d'un contact direct, ce phénomène correspond par exemple au transport d'animaux, lorsque les fèces d'un animal contaminent un autre animal (Jordan et al., 1999a; McGee et al., 2004), ou lors de l'égouttage des fromages, du fait de l'écoulement du sérum. Dans le cadre d'un contact indirect, c'est, par exemple, une machine (découpage en tranche de la viande) ou un opérateur (retourne manuelle des fromages) qui permettent le transfert des microorganismes d'un produit à l'autre. Si le procédé traite les produits à la chaîne, selon un ordre précis. Sinon, les produits s'inter-contaminent de manière aléatoire.

Quelques modèles d'appréciation quantitative du risque tiennent compte du phénomène de contamination croisée, mais à l'instar de la modélisation de la recontamination, il n'existe pas d'approche standardisée. De plus, les approches adoptées pour la contamination croisée sont similaires à celles adoptées dans le cadre de la recontamination.

Une des approches consiste à utiliser une fonction calculant la prévalence des unités contaminées. Les arguments de cette fonction peuvent être la prévalence des unités contaminées initialement et un paramètre mesurant une force de contamination croisée de l'étape considérée (Cassin et al., 1998a; Maijala et al., 2005). Dans ces modèles, le niveau de contamination des unités contaminées au cours de l'étape est estimé indépendamment de la prévalence (une hypothèse est faite sur le nombre de microorganismes apportés à une unité de production), conférant à ce type de modèles un désavantage. En effet, le transfert implique une variation du niveau de contamination des compartiments impliqués, qui n'est pas prise en compte.

Pour pallier cette lacune, (Christensen et al., 2001), dans un modèle d'appréciation de l'exposition du poulet à *Campylobacter spp.*, modélisent le niveau de contamination des carcasses suite à la contamination croisée à l'abattoir au moyen d'une fonction affine dépendant du rang des carcasses (Figure 21). La contamination des carcasses se produit par contact indirect, l'intermédiaire étant l'environnement. La justification de la décroissance linéaire des niveaux de contamination des carcasses en fonction de leur rang se justifie par le fait qu'au fur et à mesure du passage des carcasses, le nombre de microorganismes potentiellement contaminants décroît. Cependant, la valeur de la pente de la régression est difficilement estimable et dans cette étude, plusieurs valeurs sont proposées (Christensen et al., 2001; Rosenquist et al., 2003)

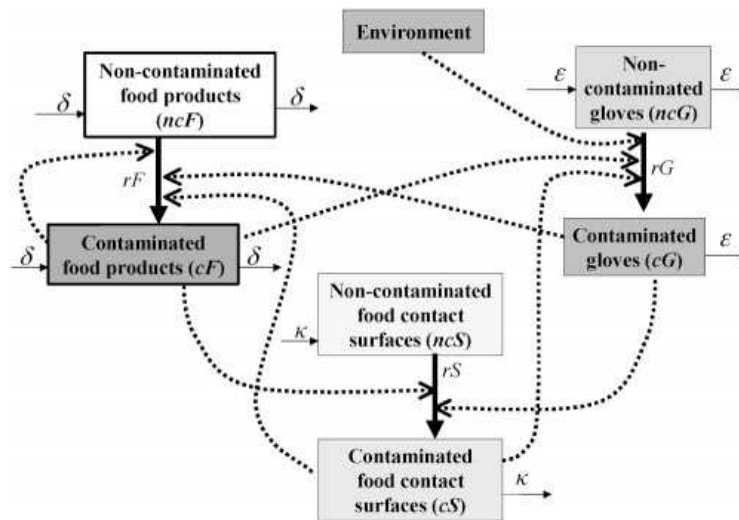


**Figure 23.** The number of cross-contaminated carcasses originating from *Campylobacter* negative flocks slaughtered after a positive flock at different values of  $T_{half}$  (= the number of broilers needed to be slaughtered, before the *Campylobacter* concentration is reduced to half the concentration) and the *Campylobacter* concentration on cross-contaminated carcasses. The concentration on the first broiler (originating from negative flocks) slaughtered after a positive flock is fixed to  $10^3$  cfu/g skin. The dotted line indicates the average minimum number of *Campylobacter*, which can be detected on a chicken carcass (approx. 1 per 100g skin).

**Figure 21 Exemple de modélisation de la contamination croisée de carcasses à l'abbatoire (Source : (Rosenquist et al., 2003))**

Pour tenir compte de la dynamique du phénomène une approche plus réaliste que celles abordées dans les exemples précédents consiste à modéliser l'évolution des variables d'intérêts (concentration ou prévalence) dans les différents compartiments d'un système favorisant la contamination croisée en tenant compte de leurs interactions spatiales et temporelles. Pour cela, le modèle peut être représenté par un système d'équations aux différences.

Ainsi dans une appréciation de l'exposition du saumon fumé à *L. monocytogenes* tenant compte des contaminations secondaires en usine, (Ivanek et al., 2004) modélisent l'évolution au cours du temps de la prévalence de contamination par *L. monocytogenes* des saumons fumés dans l'usine, celle des surfaces en contact avec les produits, celle du personnel et de l'environnement (Figure 22).



**Figure 22 Exemple de modélisation de la prévalence de contamination de saumons fumés par *L. monocytogenes***  
(Source : (Ivanek et al., 2004))

Le temps réel est discrétisé en pas de temps de 10 minutes et à chaque instant, la prévalence de *L. monocytogenes* dans chacun de ces compartiments est calculée en fonction de la probabilité de contact entre deux unités de surface, du nombre de contacts possibles pendant un pas de temps et du nombre d'unités de surfaces contaminées à l'instant précédent. Cependant, ce système complexe ne tient pas compte de l'ordre de passage des produits et les probabilités de recontamination et de contamination croisée sont finalement confondues. De plus, les niveaux de contamination des produits et de l'environnement sont estimés indépendamment des prévalences. Au contraire, (Nauta et al., 2005b) qui modélise la contamination croisée pendant l'abattage de poulets où c'est l'environnement qui joue le rôle d'intermédiaire, à l'instar de (Rosenquist et al., 2003), modélise le niveau de contamination de chacun des compartiments du modèle après le passage de l'unité de production  $k$ , en fonction des taux de transfert entre les compartiments et du niveau de contamination après le passage de la carcasse  $k-1$ . Dans ce cas, la prévalence des carcasses initialement contaminées est connue et l'interaction entre le niveau de contamination et la prévalence est prise en compte.

### 3) Conclusion sur les modèles de contaminations secondaires

Les différents types de modèles publiés aujourd'hui répondent chacun à des problématiques spécifiques. Les systèmes dynamiques sous forme d'équations différentielles continues s'appliquent facilement à des phénomènes localisés. Cependant, de tels modèles s'intègrent difficilement dans un modèle tenant compte de l'ensemble des étapes d'un processus de fabrication. Pour cela, les systèmes d'équations aux différences, dont l'échelle de temps peut varier d'une étape et d'un phénomène à l'autre (lot, produit, jour) s'adapte mieux à ce type de modèle. Enfin, une approche probabiliste, qui tient compte de la variabilité et de l'incertitude des phénomènes modélisés, fournit un résultat sous forme de distribution de probabilité tenant compte de

l'ensemble des événements possibles. Ainsi, l'approche la plus avantageuse est, selon nous, celle des modèles sous forme de systèmes d'équations aux différences couplée à une approche probabiliste.

## **B. Les paramètres de transfert**

La modélisation des phénomènes de contaminations secondaires implique de définir et d'estimer des paramètres de transfert. Le sens de ces paramètres dépend des objectifs du modèle. De plus, les méthodes d'estimation de leur valeur sont peu standardisées, rendant leur généralisation difficile.

Dans les modèles précédemment évoqués, le paramètre de transfert le plus couramment rencontré prend la forme d'une proportion de bactéries, transférée d'un compartiment vers l'autre. Le plus souvent la valeur attribuée à ces paramètres provient d'expériences microbiologiques conduites indépendamment de la modélisation. Ainsi, l'étude du FSIS (Gallagher et al., 2003) utilise les données expérimentales issues de (Midelet and Carpentier, 2002), estimant la population de *L. monocytogenes* transférée depuis diverses surfaces vers de la viande après 12 contacts. Pourtant, les résultats de ces expériences sont difficilement généralisables à des conditions environnementales et expérimentales différentes, telles que celles du FSIS, et n'avaient pas pour objectif l'estimation proprement dite d'un taux de transfert. Certaines expérimentations visent cet objectif et estiment un pourcentage de bactéries transférées entre divers surfaces et/ou produits (Chen et al., 2001; Kusumaningrum et al., 2003; Montville et al., 2001; Vorst, 2006) et sont utilisés dans des modèles d'appréciation de l'exposition tenant compte des contaminations secondaires (Kusumaningrum et al., 2004; Pérez et al., 2004a). Cependant, les taux de transfert estimés dépendent de nombreux facteurs: compartiments entre lesquels ont lieu les transferts, type de transfert, état physiologique des microorganismes, niveau et structure des contaminations et conditions expérimentales. De plus, l'étendue des taux de transfert observée est souvent très grande, parfois égale à 100% (Chen et al., 2001).

La méthode d'estimation des paramètres de transfert des modèles de contaminations secondaires, lorsqu'elle n'est pas basée sur des résultats d'expériences microbiologiques, n'est pas non plus standardisée. Ainsi, (Van der Fels-Klerx et al., 2005) modélisent de manière statistique des avis d'experts pour la valeur des paramètres du modèle de (Nauta et al., 2005b); (Ivanek et al., 2004) estiment les probabilités de contacts entre différentes unités de surfaces à partir de la fréquence des contacts entre deux unités de surfaces, du nombre d'unités de surfaces dans l'environnement, contaminées et non contaminées; (Cassin et al., 1998a; Rosenquist et al., 2003) font des hypothèses sur les valeurs des paramètres de leur modèle; (Sauli et al., 2004) estiment la probabilité de contamination des compartiments-sources et leur niveau de contamination à partir d'enquêtes épidémiologiques sur la prévalence et le niveau de contamination de *Salmonella* dans la nourriture

des porcs (céréales, soja). Ainsi, la valeur des paramètres provient de diverses sources et peu d'auteurs ont estimé les valeurs des paramètres de leur propre modèle.

Enfin, un facteur important, susceptible d'influencer la valeur de ces paramètres de transfert, est l'organisation spatiale des cellules sur les surfaces considérées. En effet, les paramètres décrits ci-dessus supposent une répartition homogène des microorganismes sur les différentes surfaces considérées. Lorsque la croissance n'est pas intégrée au modèle, cette hypothèse de répartition homogène des microorganismes sur les surfaces et sur les unités de production est plausible et le taux de transfert utilisé correspond alors à la proportion de bactéries transférées par unité de surface ou de masse. Pourtant, la prise en compte de la croissance en milieu solide, produit ou surface, complexifie le problème puisqu'une cellule fournit plusieurs cellules filles qui peuvent former des agrégats. Ainsi lorsque la croissance en milieu solide est intégrée dans un modèle plus large tenant compte des contaminations secondaires, l'interprétation physique des paramètres de transfert doit être reconsidérée.

Le paragraphe suivant présente les différents phénomènes liés aux transformations physiologiques sur des surfaces inertes ou non, en fonction des conditions environnementales et susceptibles d'interagir avec les phénomènes de contaminations secondaires.

## **II. Evolution des charges microbiennes liée aux conditions environnementales**

L'évolution des charges microbiennes en fonction des conditions physico-chimiques environnementales fait l'objet d'une attention particulière dans le cadre de la recherche tant du point de vue microbiologique que de celui de la modélisation. Dans un objectif d'intégration des phénomènes de contaminations secondaires dans un modèle d'appréciation de l'exposition, nous avons choisi d'orienter cette revue vers la croissance microbienne en milieu solide (surfaces inertes et matrices alimentaires solides) et la réduction des populations microbiennes.

L'état d'avancement de la recherche des points de vue microbiologique et de la modélisation varie d'un phénomène à l'autre. Ainsi, nous tentons de présenter pour chacun d'eux les modèles associés, s'ils existent, et une revue bibliographique des résultats expérimentaux permettant leur compréhension en vue d'une proposition de stratégie de modélisation.

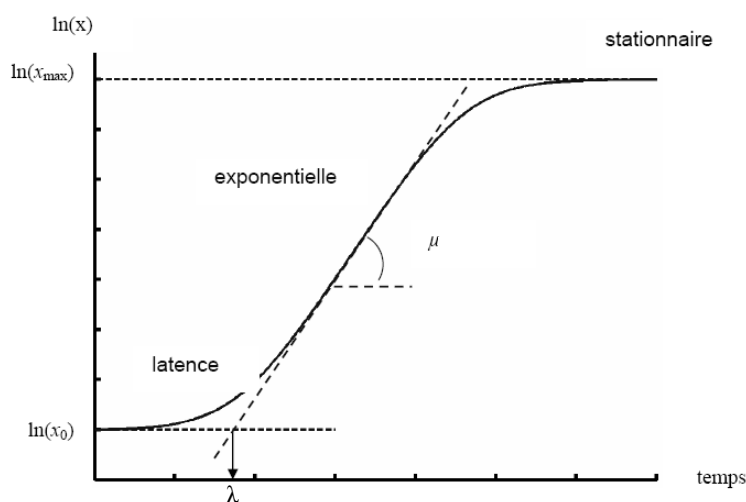
## A. Croissance des bactéries

Nous considérons la croissance des bactéries en milieu solide sur surfaces inertes ou dans des denrées alimentaires en cours de production. Nous entendons par « surface inerte » toute surface se trouvant dans l'usine et dont la propreté physique est obtenue par lavage à l'aide d'un détergent et d'un rinçage à l'eau. Les bactéries présentes dans les denrées alimentaires, peuvent croître sur la surface ou à l'intérieur d'un produit. Des modèles de croissance complexes et performants existent et prédisent avec une assez bonne précision l'évolution d'une population microbienne dans une denrée alimentaire, alors que l'étude de la croissance microbienne sur des surfaces inertes reste encore expérimentale.

### 1) Contamination des denrées alimentaires solides

#### a. Croissance triphasique

La cinétique des populations bactériennes se décompose en trois phases distinctes (Buchanan et al., 1997) (Figure 23) : (1) la phase de latence, caractérisée par une vitesse de multiplication nulle. Cette phase correspond à une adaptation de l'inoculum à son environnement de croissance ; (2) la phase exponentielle de croissance lors de laquelle le nombre de cellules augmente de manière exponentielle au cours du temps ; (3) la phase stationnaire, qui correspond à un arrêt de la croissance, la population microbienne ayant atteint une densité maximale.



**Figure 23** Cinétique de croissance bactérienne et paramètres caractérisant ses trois phases, avec  $\mu_{\max}$ , le taux de croissance maximum,  $\lambda$ , le temps de latence et  $x_0$  et  $X_{\max}$ , les concentrations cellulaires initiale et maximale

## b. Modèles de croissance primaires et secondaires

Les modèles primaires modélisent l'évolution de la population (ou de la concentration) bactérienne viable en fonction du temps. Le modèle primaire considéré dans cette étude est le modèle logistique avec délai (Baranyi et al., 1993; Kono, 1968; Rosso, 1996), c'est-à-dire, avec un point de coupure entre la phase de latence et la phase exponentielle, sous sa forme différentielle (Équation 1, Figure 23).

$$\begin{cases} x(t) = x_0 & t = 0 \\ \frac{dx}{dt}(t) = 0 & \text{si } t \leq \lambda \\ \frac{dx}{dt}(t) = \mu \cdot x(t) \cdot \left(1 - \frac{x(t)}{X_{\max}}\right) & \text{si } t > \lambda \end{cases}$$

**Équation 1. Modèle de croissance primaire logistique avec délai**

Dans ce modèle, on considère un inoculum contenant  $x_0$  microorganismes, à l'instant  $t = 0$ . L'état physiologique des bactéries présentes dans l'inoculum détermine la durée de la phase de latence ( $\lambda$ ), en heures. Si les bactéries ont subi un stress puis sont placées en conditions environnementales favorables à la croissance, la phase de latence se décompose en deux sous-phases, la première est le temps nécessaire aux bactéries survivantes au stress précédant leur inoculation de se régénérer, et la deuxième est le temps nécessaire pour s'adapter aux nouvelles conditions environnementales (Ross and McMeekin, 2003). Lorsque les bactéries ne sont pas stressées, la phase de latence est réduite à la phase d'adaptation aux conditions environnementales.

Au cours de la phase exponentielle des divisions cellulaires se produisent, selon un taux ou une vitesse spécifique dit maximal de croissance ( $\mu$ ), en nombre de cellules sur une échelle logarithmique par unité de temps. Le paramètre  $\mu$  dépend des conditions et de la matrice alimentaire contaminée. Les bactéries se multiplient jusqu'à atteindre une population ou une concentration maximale dans le milieu de culture ( $X_{\max}$ ), correspondant à la phase stationnaire du modèle. La valeur du paramètre  $X_{\max}$  du modèle de croissance primaire varie en fonction du type de matrice alimentaire, solide ou liquide.

Ce modèle est le plus souvent utilisé sous sa forme résolue donnée par l'Équation 2. L'application du modèle sous cette forme suppose cependant que  $\mu$  est constant pour tout  $t$ , impliquant des conditions environnementales fixes.

$$\begin{aligned}
 x(t) &= X_0 && \text{si } t \leq \lambda \\
 x(t) &= \frac{X_{\max}}{1 + \left(\frac{X_{\max}}{X_0} - 1\right) \cdot e^{-\mu \cdot t}} && \text{si } t > \lambda
 \end{aligned}$$

**Équation 2. Modèle de croissance primaire logistique avec délai pour des conditions environnementales fixes**

Le taux de croissance  $\mu$  en fonction des paramètres physico-chimiques (notamment la température, l'activité de l'eau et le pH) est décrit par les modèles secondaires. De nombreux modèles de ce type ont été développés au cours des dix dernières années, se répartissant dans deux classes principales de modèles: les modèles polynomiaux et les modèles cardinaux. Nous nous intéressons plus particulièrement aux modèles cardinaux, ceux-ci présentant l'avantage d'être constitués de paramètres ayant un sens biologique (Le Marc, 2001). Pour une revue détaillée des modèles cardinaux secondaires, nous renvoyons à (Augustin et al., 2005). Dans cet article, les paramètres de plusieurs de ces modèles sont estimés pour différentes matrices alimentaires, à partir d'une revue exhaustive de la littérature sur les taux de croissance de *L. monocytogenes* dans différents produits alimentaires (produits laitiers, produits carnés, produits de la mer) et différentes conditions environnementales. De plus, un nouveau modèle cardinal secondaire (modèle « 5bis » dans l'article) tenant compte des interactions entre les différents paramètres physico-chimiques est proposé, fournissant des valeurs de paramètres pour différentes matrices alimentaires, y compris les fromages. Ce modèle est initialement proposé pour un grand nombre de paramètres physico-chimiques mais il s'adapte au cas d'un nombre réduit de paramètres. Pour des valeurs de température, de pH et d'activité de l'eau données à l'instant  $t$ , respectivement  $T(t)$ ,  $pH(t)$  et  $a_w(t)$ , le modèle décrivant le taux de croissance à l'instant  $t$ ,  $\mu(t)$ , est donné par l'Équation 3.



$$\mu(t) = \mu_{\text{opt}} \times \text{CM}_2(T(t)) \times \text{CM}_1(\text{pH}(t)) \times \text{SR}_1(\text{aw}(t)) \times \xi(T(t), \text{pH}(t), \text{aw}(t)),$$

avec pour tout X et Y  $\in \{T(t), \text{pH}(t), \text{aw}(t)\}$

$$\xi = \begin{cases} 1 & \text{si } \psi \leq 0,5 \\ 2 \times (1 - \psi) & \text{si } 0,5 < \psi < 1 \\ 0 & \text{si } \psi \geq 1 \end{cases}, \quad \psi = \sum_x \frac{\phi(X)}{2 \times \prod_{X \neq Y} (1 - \phi(Y))}, \quad \phi(X) = \left( \frac{X_{\text{opt}} - X}{X_{\text{opt}} - X_{\text{min}}} \right)^3$$

$$\text{SR}_n(X) = \begin{cases} 0 & \text{si } X < X_{\text{min}} \\ \left( \frac{X - X_{\text{min}}}{X_{\text{opt}} - X_{\text{min}}} \right)^n & \text{si } X_{\text{min}} < X < X_{\text{max}} \end{cases},$$

$$\text{CM}_n(X) = \begin{cases} 0 & \text{si } X \leq X_{\text{min}} \\ \frac{(X - X_{\text{max}})(X - X_{\text{min}})^n}{(X_{\text{opt}} - X_{\text{min}})^{n-1} [(X_{\text{opt}} - X_{\text{min}})(X - X_{\text{opt}}) - (X_{\text{opt}} - X_{\text{max}})((n-1)X_{\text{opt}} + X_{\text{min}} - nX)]} & \text{si } X_{\text{min}} < X < X_{\text{max}} \end{cases}$$

**Équation 3. Modèle de croissance secondaire proposé dans (Augustin et al., 2005)**

Les paramètres  $X_{\text{min}}$ ,  $X_{\text{max}}$  et  $X_{\text{opt}}$  sont les valeurs cardinales de croissance pour  $X \in \{\text{Température}, \text{aw}, \text{pH}\}$  :  $X_{\text{min}}$  et  $X_{\text{max}}$  sont les valeurs minimale et maximale de croissance, respectivement, et  $X_{\text{opt}}$  est la valeur du paramètre X à laquelle le taux de croissance  $\mu$  est optimal. Les fonctions modulaires  $\text{CM}_1$ ,  $\text{CM}_2$ ,  $\text{SR}_1$  représentent les effets relatifs des différents paramètres physico-chimiques sur le taux de croissance. L'effet combiné de ces facteurs est obtenu par le produit des effets séparés et de la fonction  $\xi$  modélisant l'interaction entre les paramètres (Le Marc, 2001).

Dans le cadre de notre étude, nous utiliserons ce modèle et les estimations des valeurs cardinales issues d'ajustement de données expérimentales sur ce modèle pour modéliser la phase exponentielle de la croissance de *L. monocytogenes*.

### c. Modélisation de la phase exponentielle en conditions dynamiques

Les modèles secondaires proposés permettent l'estimation de taux de croissance spécifiques, en conditions environnementales constantes. Or, le plus souvent, les conditions environnementales lors de la production d'aliments varient au cours du temps, impliquant une variation des taux de croissance spécifiques. Une solution pour en tenir compte dans le calcul de  $X(t)$  consiste à découper le temps en intervalles les plus petits possibles. A chaque intervalle de temps, les conditions environnementales sont supposées constantes et

l'augmentation de la population microbienne est calculée à partir du taux de croissance spécifique aux conditions environnementales de l'intervalle de temps considéré (taux de croissance instantané). Dans le cadre de la simulation de la phase exponentielle, cette méthode ne peut être utilisée pour des fluctuations importantes des paramètres environnementaux dans un cours instant, qui pourraient alors induire un temps de latence avant reprise de la croissance. De plus, elle ne peut être appliquée à des modèles primaires pour lesquels phases de latence et exponentielle ne sont pas modélisées de manière indépendante (par exemple, le modèle polynomial de Gompertz). En effet, un temps de latence serait généré pour chaque intervalle de temps. Par contre, cette solution est adaptée au modèle logistique avec délai.

#### d. Modélisation de la phase de latence

La prise en compte de l'impact de l'état physiologique des cellules sur la phase de latence permettant la régénération des cellules et l'adaptation des cellules avant multiplication peut être déterminante dans le cadre de l'estimation des niveaux de contamination de denrées alimentaires, notamment lorsque l'on tient compte des contaminations secondaires. En effet, dans ce cas, les microorganismes de l'environnement potentiellement contaminants sont dans un état physiologique peu favorable à la croissance. Lorsque les cellules se trouvent dans des conditions de croissance favorables, elles entrent en phase exponentielle seulement lorsque leur temps de latence s'est écoulé (cf. le modèle logistique avec délai). Ainsi, cette phase est une limitation naturelle de la croissance et sa prise en compte permet d'éviter la surestimation des niveaux de contamination dans le cadre d'un modèle d'appréciation de l'exposition à une bactérie pathogène dans les aliments.

Certains auteurs ont mis en évidence une corrélation entre le temps de latence  $\lambda$  et l'inverse du taux de croissance  $1/\mu$ , pour des conditions de re-croissance données (Cooper, 1963; Rosso, 1995). Cette approche suppose que le produit  $\lambda \times \mu$  ne dépend pas des conditions de re-croissance mais uniquement des conditions pré-incubatoires. (Robinson et al., 1998) ont décrit ce produit, noté  $Q$ , comme le travail à accomplir par les cellules afin de pouvoir entrer en phase exponentielle de croissance. Lorsque la phase exponentielle débute,  $\lambda$  et  $Q$  sont donc nuls.

La modélisation du temps de latence  $\lambda_{CRC}$  des cellules en fonction du taux de croissance  $\mu_{CRC}$  et de la quantité de travail avant reprise de croissance  $Q_S$ , pour des conditions pré-incubatoires  $S$  et des conditions de re-croissance CRC est donnée par l'Équation 4.

$$\lambda_{CRC} \times \mu_{CRC} = Q_S, \text{ où } Q_S \text{ est constant } \forall \text{ CRC},$$

**Équation 4. Modélisation de la phase de latence**

Des travaux récents ont permis d'estimer la distribution des temps de latence individuels de cellules stressées en fonction des conditions environnementales (Guillier, 2005). Ces travaux s'appliquent à la bactérie *L. monocytogenes*, et ont consisté à reproduire divers stress environnementaux, rencontrés en industrie agroalimentaire, notamment fromagère. Les résultats, expérimentaux mais se rapprochant le plus possible des conditions réelles, fournissent pour chaque stress la réduction de la population microbienne résultant du stress et la distribution des temps de latence individuels des cellules de *L. monocytogenes*, et ce pour des conditions de re-croissance données. On peut alors déduire de ces valeurs les quantités de travail associées ( $Q(S)$ ). Couplés aux résultats de (Kutalik et al., 2005), ces travaux permettent d'obtenir la distribution des temps de latence populationnels, correspondant au temps nécessaire pour un inoculum contenant plusieurs cellules pour débiter la phase exponentielle de croissance (Swinnen et al., 2004), pour différents stress.

Pour une cellule individuelle, l'évolution de la phase de latence au cours du temps est relativement simple à modéliser en conditions environnementales de re-croissance constantes et on peut alors exprimer son ampleur sous la forme d'une durée : Si  $\lambda(t)$  est le temps de latence restant avant l'entrée en phase exponentielle à l'instant  $t$ , alors, pour  $t_1 < t_2$ ,  $\lambda(t_2) = \lambda(t_1) - (t_2 - t_1)$ .

En conditions environnementales dynamiques, où  $\mu$  varie à chaque instant, l'expression du temps de latence  $\lambda(t_2)$  est plus complexe. En effet, on a pour tout  $t \geq 0$  :  $Q(t) = \lambda(t) \times \mu(t)$ , où  $\mu(t)$  est le taux de croissance relatif aux conditions environnementales à l'instant  $t$ .

$$\text{A } t = 0, Q(0) = \lambda(0) \times \mu(0).$$

$$\text{A } t = dt, \lambda(dt) = \lambda(0) - dt \text{ et } Q(dt) = (\lambda(0) - dt) \times \mu(0) = Q(0) - \mu(0) \times dt.$$

$$\text{A } t = 2dt, Q(2dt) = (\lambda(dt) - dt) \times \mu(dt) = \left( \frac{Q(dt)}{\mu(dt)} - dt \right) \times \mu(dt).$$

Soit  $N = \frac{t}{dt}$ . Par récurrence, on montre qu'à un instant  $t$  quelconque :

$$\begin{aligned} Q(t) &= Q(N \times dt) = \left( \frac{Q((N-1) \times dt)}{\mu((N-1) \times dt)} - dt \right) \times \mu((N-1) \times dt) \\ &= Q((N-1) \times dt) - \mu((N-1) \times dt) \times dt \\ &= Q(0) - \mu(dt) \times dt - \mu(2dt) \times dt - \dots - \mu((N-2) \times dt) \times dt - \mu((N-1) \times dt) \times dt \\ &= Q(0) - \sum_{i=1}^{N-1} \mu(i \times dt) \times dt \end{aligned}$$

$$\text{Si } dt \rightarrow 0, Q(t) = Q(0) - \int_0^t \mu(s) \times ds.$$

Dans le cadre du calcul de la phase de latence entre les instants  $t_1$  et  $t_2$ , nous obtenons :

$$Q(t_2) = Q(t_1) - \int_{t_1}^{t_2} \mu(s) \times ds \text{ et } \lambda(t_2) = \frac{\left( Q(t_1) - \int_{t_1}^{t_2} \mu(s) \times ds \right)}{\mu(t_2)}$$

Ainsi, en conditions environnementales dynamiques, il est préférable de considérer l'évolution de la quantité de travail à accomplir  $Q$  au cours du temps plutôt que celle du temps de latence  $\lambda$ , l'obtention de ce dernier nécessitant deux étapes supplémentaires de calcul.

#### e. Taux de croissance dans une matrice alimentaire solide

En milieu liquide et en conditions expérimentales, chaque cellule en phase exponentielle se divise pour former deux cellules-filles isolées, supposées viables et capables de se multiplier, ceci étant garanti notamment par l'agitation continue du substrat dans l'objectif de détacher les cellules-filles des cellules-mères. En milieu solide, à la surface ou à l'intérieur d'une denrée alimentaire, les cellules forment des colonies. Or cette organisation spatiale des cellules peut avoir un impact sur leur viabilité et leur état physiologique, résultant en une différence entre les taux de croissance en milieu solide et ceux en milieu liquide.

Deux facteurs sont susceptibles de limiter la croissance des bactéries en milieu solide: les interactions inter-colonies, résultant de la concurrence entre colonies voisines, de la même espèce ou non, pour les nutriments et pour l'espace physique disponible (Dens and Van Impe, 2000), et les interactions intra-colonies, résultant, de la même manière, de la concurrence entre cellules-filles d'une même colonie pour l'espace et les nutriments (Malakar et al., 2003) ou encore des modifications métaboliques locales, tels que le déclin possible du pH à l'intérieur même de la colonie (Wilson et al., 2002).

L'impact de la compétition microbienne intra-colonie est relativement important lorsque le métabolite inhibiteur pour le microorganisme cible est aussi inhibiteur pour le producteur (à concentration évidemment plus élevée) et que le coefficient de diffusion du métabolite dans le milieu est faible : plus il est faible, plus la concentration du métabolite augmente rapidement au contact immédiat de la colonie productrice. Les inhibitions au sein de la colonie deviennent non négligeables par rapport aux effets entre colonies. (Malakar et al., 2002) souligne cependant que ces inhibitions « internes » nécessitent un nombre important de cellules : plus de  $10^5$ , soit une colonie de l'ordre de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cela suggère de plus que les cellules de colonies dont la taille est inférieure à  $10^5$  sont dans un état physiologique similaire.

La compétition microbienne, relative aux interactions inter-colonies en milieu solide, a fait l'objet de différents travaux de modélisation (Dens and Van Impe, 2000; Dens et al., 1999; Thomas et al., 1997). La compétition inter-colonies se produit sur deux niveaux :

- entre colonies constituées de cellules pathogènes. Dans ce cas, son impact est relativement faible car on peut supposer que les colonies sont suffisamment espacées
- entre la flore technologique de la matrice alimentaire et les colonies de cellules pathogènes : dans ce cas, les cellules de la flore technologique forment une couche cellulaire et l'impact des interactions inter-colonies est relativement important.

(Malakar et al., 2003) montrent que lorsque la taille des colonies n'est pas supérieure à  $10^5$  bactéries par colonie (cas d'expérimentations utilisant des inoculums élevés), la croissance en milieu solide peut être apparentée à la croissance en milieu liquide. Or, les expérimentations permettant l'estimation des taux de croissance des bactéries sont le plus souvent conduites en milieu liquide avec des inocula élevés. Les valeurs expérimentales obtenues conviennent donc pour simuler la croissance en milieu solide, bien que, concernant *L. monocytogenes*, les taux de croissance dans diverses matrices alimentaires solides, sont disponibles (Augustin et al., 2005).

## **2) Contamination des surfaces inertes**

Parmi les surfaces les plus contaminées d'une usine agro-alimentaire, on trouve les sols, les tapis convoyeurs, les surfaces en acier inoxydable. La contamination de ces surfaces est renforcée par des taux d'humidité élevés (Chmielewski and Franck, 2003). L'environnement industriel fromager présente de telles caractéristiques, notamment dans les hâloirs d'affinage, où le taux d'humidité relative avoisine 98%, et les machines en acier inoxydable, sont fréquemment nettoyées. Dans ce contexte, nous limiterons cette revue bibliographique au cas des surfaces en acier inoxydable et des revêtements de sol.

### **a. Organisation spatiale des cellules sur des surfaces**

Nous utilisons le terme *biofilm* pour évoquer la présence de microorganismes adhérents à une surface inerte, qu'elle quelle soit, à l'instar de (Carpentier and Cerf, 1999) qui définissent un *biofilm* comme suit : « communauté microbienne, adhérent à une surface et fréquemment ancrée dans une matrice extracellulaire ». La formation d'un biofilm suppose des conditions de croissance favorables pour les cellules, telles que la présence de nutriments ou une température environnante adéquate. Les étapes de formation d'un biofilm sont les suivantes (Chmielewski and Franck, 2003) : après que des cellules planctoniques aient adhéré à une surface après un temps de contact plus ou moins long, une partie des cellules adhèrent de manière irréversible (les cellules résistent à un rinçage, notion définie par (Marshall et al., 1971) et se structurent souvent sous

forme d'agrégats. Les cellules de périphérie croissent plus vite que celles présentes au centre du biofilm car elles ont plus de nutriments à leur disposition (Hood and Zottola, 1995) (Beresford et al., 2001).

Plus particulièrement, les cellules présentes sur des surfaces fréquemment nettoyées et désinfectées se présentent sous la forme de micro-colonies espacées les unes des autres (Carpentier and Cerf, 1999). Concernant *L. monocytogenes*, l'influence de la flore environnante limite souvent son adhérence. Dans d'autres cas plus rares, la flore environnante favorise l'adhésion de *L. monocytogenes*, qui se présente alors sous forme de cellules « greffées » aux micro-colonies des autres bactéries (Carpentier and Chassaing, 2004; Norwood and Gilmour, 2001). Certains auteurs ont observé qu'en 72 heures à température ambiante, 1 souche de *L. monocytogenes* sur 35 en culture pure est capable de former des agrégats de cellules (Kalmokoff et al., 2001), les autres se présentant sous forme de cellules isolées. Par contre, en présence d'un milieu de culture synthétique, elle est capable de former des agrégats de cellules au bout de deux jours (Chavant et al., 2004; Chavant et al., 2002).

L'adhérence et la croissance des cellules sur les surfaces, plus particulièrement *L. monocytogenes*, ayant un impact sur le mécanisme des contaminations secondaires, dépendent d'un grand nombre de facteurs que nous présentons dans le paragraphe suivant.

#### b. Formation des biofilms sur les surfaces inertes

##### *Sur les surfaces de machines en acier inoxydable*

Les cellules présentes sur une surface en contact avec les produits sont généralement éliminées par les fréquentes opérations de nettoyage et de désinfection appliquées sur ces surfaces. Si la charge microbienne est très élevée et/ou si les opérations de nettoyage sont mal appliquées, des cellules peuvent survivre et rester sur la surface. L'adhésion des souches de *L. monocytogenes* en 72 heures est possible mais elle ne concerne qu'une faible proportion de cellules (Chae and Schraft, 2000; Lunden et al., 2000). Ceci est confirmé par Graziella et al qui observe que les forces d'adhésion de *L. monocytogenes* sur l'inox sont nettement inférieure à celles mesurées sur tapis convoyeur (Midelet and Carpentier, 2002; Midelet et al., 2006). De plus, en culture pure, (Helke, 1994) observent qu'après adhésion de *L. monocytogenes* à l'acier inoxydable, le niveau de population reste stable à moins de 20°C et ce, pendant dix jours, suggérant ainsi que *L. monocytogenes* ne se multiplie pas dans ces conditions.

Ainsi on peut conclure que les cellules présentes sur une surface en acier inoxydable fréquemment nettoyées ne croissent pas sur les machines et inox et sont facilement détachées lors de contact avec les produits.

### *Sur les revêtements de sol*

Les sols des usines agroalimentaires sont généralement caractérisés par la présence d'une flore microbienne résidente suggérant la présence de nutriments permettant la croissance de la bactérie *Listeria*. De même que pour les machines, des cellules pathogènes présentes sur les sols sont susceptibles de contaminer les produits en cours de production.

Peu d'études expérimentales sur la présence de *Listeria* sur les revêtements de sols ont été conduites, bien que les observations montrent que cette bactérie y soit fréquemment localisée. Cependant, un grand nombre d'études tentent de reproduire les conditions environnementales du sol sur des matériaux différents de ceux utilisés pour les revêtements de sol. Les cellules de *L. monocytogenes* dans l'environnement étant exposées à des fluctuations du niveau et du type de nutriments, nous avons distingué deux cas : *L. monocytogenes* en présence et en absence de nutriments.

Le stress nutritionnel se traduit généralement par une perte rapide d'une partie importante de la population, suivie d'un maintien de la fraction survivante pendant de longues périodes (Herbert and Foster, 2001; Lou and Yousef, 1996). Ainsi, entre 0,1 et 5 % de cellules de *L. monocytogenes* reste viable après 20 jours à 37°C sans nutriments. Les cellules survivantes au stress nutritionnel présentent des tailles de cellules réduites et accroissent leur protection contre divers stress environnementaux (Herbert and Foster, 2001).

Si des nutriments sont disponibles, les résultats relatifs à la croissance de *Listeria* en présence d'une flore microbienne montrent que différentes situations existent (Carpentier and Chassaing, 2004).

(Leriche and Carpentier, 2000) observent qu'en présence d'un biofilm de *Staphylococcus sciuri*, dont la présence dans l'environnement des fromageries est démontrée (Mettler and Carpentier, 1998), la croissance de *L. monocytogenes* peut être diminuée, de même qu'en présence d'une bactérie produisant des bactériocines (Leriche, 1999b). De plus, la présence de lait ou de protéines du lait réduit aussi l'adhérence de *Listeria* (Helke et al., 1993).

Des résultats différents ont été obtenus sur des carreaux de céramique : quelque soit le milieu de culture utilisé, TSB-YE dilué au 1/20<sup>ème</sup> ou lactosérum, la présence d'un biofilm plurimicrobien, cultivé à 25°C et constitué d'une flore à Gram positif, avec présence ou non de *Pseudomonas*, stimule légèrement l'adhésion de *L. monocytogenes*. Concernant sa croissance dans un tel biofilm, la population reste relativement stable ou augmente en 5 jours, à 25°C, malgré les désinfections quotidiennes, en fonction du milieu de culture, suggérant que *Listeria* est capable de croître mais que cette croissance peut être compensée par les mesures d'hygiène.

Or, dans le cas particulier d'une fromagerie, dont les revêtements de sol sont le plus souvent constitués de carreaux de céramique séparés par des joints, la population microbienne des hâloirs d'affinage peut atteindre 6 log CFU/cm<sup>2</sup> après 10 jours (Alliot, 1999), du fait d'une température adéquate pour la croissance des bactéries, de la présence de nutriments et d'un taux d'humidité souvent très élevé. Cette population microbienne est caractérisée par la présence majoritaire de *Pseudomonas* (Alliot, 1999). Ainsi, les derniers résultats microbiologiques évoqués suggèrent que *L. monocytogenes* est capable d'adhérer et de se multiplier sur les sols des hâloirs d'affinage, ce qui est confirmé par les observations du terrain (cf. Chapitre II).

#### c. Taux de croissance sur les surfaces inertes

L'observation de la croissance dans un biofilm se fait généralement à travers l'étude de la population finale de cellules adhérentes. Or les cellules filles issues de la croissance peuvent se développer, soit sous forme agrégées du fait de la formation d'exopolymères (Chavant et al., 2004; Chavant et al., 2002), soit sous forme de cellules planctoniques. Dans ce cadre, des protocoles expérimentaux tenant compte de la population planctonique issue de la croissance sur les surfaces d'intérêt devraient être conduits, à l'instar de (Leriche and Carpentier, 2000) qui montrent que le nombre de *L. monocytogenes* adhérentes dans un biofilm de *Staphylococcus sciuri* sur l'acier inoxydable reste stable après trois jours, alors que le nombre de cellules planctoniques augmente. Dans ce cadre, les taux de croissance observés sur surfaces inertes restent difficiles à évaluer, les résultats expérimentaux ne tenant compte généralement que de la population adhérente. De plus, cette observation suggère que les cellules se multipliant sur une surface ne sont pas transférées dans leur totalité lors d'un contact, puisqu'une partie des cellules seulement est adhérente.

#### d. Modélisation de la croissance sur des surfaces inertes

A notre connaissance très peu d'études ont tenté de modéliser la formation des biofilms sur des surfaces inertes dans un objectif d'intégration dans un modèle d'appréciation de l'exposition à un risque microbiologique. Les modèles existants se concentrent sur la croissance sur les surfaces en milieu liquide, en tenant compte de l'adhérence des bactéries et leur multiplication (den Aantrekker, 2003; Takhistov and George, 2004). Généralement, les modèles de croissance développés en milieu liquide sont transposés au milieu solide. Notamment (Fujikawa and Morozumi, 2005) utilise le modèle logistique de croissance pour *Escherichia coli* sur des boîtes de Petri, confirmant l'existence d'une phase de croissance exponentielle à la suite d'une phase de latence des bactéries, et précédant une phase de stabilisation du niveau de population seuil. Cependant, dans un contexte d'intégration de la croissance sur surfaces inertes dans un modèle plus général, il semble plus raisonnable de se contenter d'un modèle exponentiel simple basé sur le temps de génération des cellules, du fait du manque de résultats expérimentaux et de connaissances quantitatives sur ce phénomène. Dans ce cas, la modélisation de la croissance des microorganismes sur des surfaces inertes



nécessite de connaître deux principaux paramètres : le taux de croissance des cellules et le nombre maximal de cellules issues d'une seule cellule, si l'on suppose que les cellules se développent sous forme d'agrégats (Chavant et al., 2004; Chavant et al., 2002), le temps de latence des cellules étant dépendant d'un stress préalable.

La valeur des taux de croissance de *L. monocytogenes* sur des surfaces inertes d'un environnement fromager est difficile à évaluer. Cette valeur dépend de la présence de nutriments, qui n'est qualitativement et quantitativement pas optimale, du pH des surfaces, compris entre 7 et 8 sur un sol de hâloir (communication personnel, Mettler, E.), de la quantité d'eau disponible, et de la température. Tous ces facteurs sont variables d'une étape à l'autre, voire au sein d'une étape. Globalement, ces conditions ne permettent pas une croissance rapide des cellules.

Les cellules se multipliant sur des surfaces sont regroupées sous forme d'agrégats et la quantité de nutriments disponibles à l'endroit même de l'agrégat diminue lorsque le nombre de cellules augmentent, jusqu'à atteindre une population maximale, du fait de la consommation de la totalité des nutriments. La connaissance du seuil atteint par la population d'un biofilm permet de déduire un ordre de grandeur du nombre de cellules-filles générées par une cellule-mère et par conséquent, de connaître la taille maximale d'un agrégat de cellules.

Dans un aliment, dans lequel l'apport nutritionnel est élevé, la taille d'une colonie ne dépasse pas l'ordre de grandeur de 100  $\mu\text{m}$  de diamètre, ce qui correspond à une population microbienne moyenne s'élevant  $10^5$  cellules (Malakar et al., 2002). L'apport nutritionnel des surfaces environnementales étant moins important que celui des aliments, on en déduit dans un premier temps qu'une seule cellule ne peut générer plus de  $10^5$  cellules.

En biofilm, les niveaux de population sont généralement mesurés en nombre de colonies formant unité par centimètres carrés (CFU/cm<sup>2</sup>). Nous avons répertorié quelques niveaux de population, atteints par *L. monocytogenes* dans un biofilm sur différentes surfaces. (Chae and Schraft, 2000) observent des niveaux de population sur du verre de l'ordre de  $10^5$  CFU/cm<sup>2</sup> en partant d'un niveau de population de *L. monocytogenes* adhérente de  $10^3$  CFU/cm<sup>2</sup>. En présence de lait cru ou pasteurisé l'augmentation de la population d'un biofilm de *Listeria* sur de l'acier inoxydable à 37°C est de  $10^2$  CFU/cm<sup>2</sup>. Ces résultats suggèrent que dans les conditions de ces deux expériences, chaque cellule initialement adhérente est capable de générer en moyenne 100 cellules-filles adhérentes. Cet ordre de grandeur est confirmé par les travaux de thèse de Valérie Leriche, qui montre que dans un biofilm plurimicrobien cultivé dans du TSB-YE dilué, la population adhérente de *L. monocytogenes* passe de  $10^4$  CFU/cm<sup>2</sup> à  $10^{6.5}$  CFU/cm<sup>2</sup> en 5 jours (Leriche, 1999a). Ces résultats ne tiennent pas compte de la croissance des cellules planctoniques, généralement éliminées aux cours des expérimentations et dont on ne peut évaluer le niveau de population atteint.

D'après ces résultats expérimentaux, on peut supposer qu'une cellule-mère est capable de générer entre  $10^2$  et  $10^5$  cellules.

## **B. Réduction de la population microbienne suite aux mesures d'hygiène**

Les mesures d'hygiène dans l'environnement ont pour objectif l'élimination des bactéries dans l'environnement et la prévention des contaminations secondaires des produits en cours de production. Cependant leur efficacité reste partielle, d'autant plus dans des conditions reproduisant la réalité industrielle, comme nous le verrons dans le présent paragraphe.

Une opération d'hygiène se décompose en deux phases:

- Le nettoyage : cette étape, réalisée à l'aide produits chimiques alcalins et d'une action mécanique, permet de dissoudre, au moins partiellement, les résidus organiques. Un nettoyage acide peut aussi être pratiqué périodiquement pour éliminer les résidus minéraux.
- La désinfection : Cette étape permet de réduire la viabilité des microorganismes ayant résisté à la phase de nettoyage.

Il est montré que les opérations d'hygiène dans l'environnement sont en général plus efficaces :

- sur des cellules planctoniques que sur des cellules adhérentes, notamment pour *L. monocytogenes* (Chavant et al., 2004; Frank and Koffi, 1990; Helke et al., 1993; Robbins et al., 2005),
- sur des biofilms jeunes que sur des biofilms plus âgés,
- sur des cellules stressées que sur des cellules non stressées.

Concernant l'efficacité des agents chimiques sur les cellules planctoniques, (Taormina and Beuchat, 2002) observent que l'action de nettoyage de 5 nettoyants utilisés couramment dans les usines agro-alimentaires (exposition des cellules à une solution alcaline pendant 30mn à 4°C) permet moins de 1,63 réductions décimales de la population de *L. monocytogenes*. Par contre, l'application de désinfectants, suite à cette étape de nettoyage, permet 7 réductions décimales de la population de *L. monocytogenes*. Dans une autre expérience, différents agents chimiques désinfectants ont été testés sur des cellules planctoniques de *L. monocytogenes* et ont fourni entre 7 et 8 réductions décimales (Helke et al., 1993). Ces études mettent globalement en évidence le caractère peu résistant des souches planctoniques de *L. monocytogenes* aux agents désinfectants.

Concernant l'efficacité des agents chimiques sur les cellules adhérentes, issues de biofilms d'au moins un jour, les résultats montrent que la diminution de la population de *L. monocytogenes* est très variable, de 0,3 à 7 réductions décimales. Elle dépend de la surface testée (Helke et al., 1993), de l'âge du biofilm (Lee and

Frank, 1991), du type de nutriments (Leriche, 1999a), du type de biofilm (Leriche, 1999a), de l'état physiologique des cellules (Leriche, 1999a), du type d'agent chimique (Frank et al., 2003; Gibson et al., 1999) et de la concentration en agent chimique (Norwood and Gilmour, 2000).

Nous nous intéressons plus particulièrement aux résultats obtenus en conditions se rapprochant le plus des conditions observées en usine. En effet, les souches utilisées lors d'expérimentation en laboratoire n'ont pas le même état physiologique que les souches du terrain. Ces dernières ont pu développer une tolérance aux agents chimiques, permettant ainsi une résistance plus grande que celle des souches utilisées en laboratoire : c'est le phénomène de « *cross resistance* » (Langsrud et al., 2003; Taormina and Beuchat, 2001). De plus, ces cellules se développent généralement aux côtés d'une flore microbienne résidente qui peut avoir un effet protecteur de *Listeria*, vis-à-vis des désinfectants (Bourion et al., 1996; Leriche, 1999b).

Une étude comparant les observations obtenues sur le terrain et celles obtenues en laboratoire (Gibson et al., 1999) donne des résultats particulièrement intéressants bien que non appliqués à *L. monocytogenes*. Les auteurs observent que 0,91 log CFU de la population microbienne est détruit pendant le nettoyage en usine et seulement 1,21 log CFU pendant la désinfection. Ces résultats sont une moyenne d'environ 4500 échantillons prélevés dans huit usines sur une période non précisée. L'étude montre aussi qu'en phase de nettoyage, l'action mécanique améliore l'efficacité des agents de nettoyage : après application d'un détergent et d'un rinçage sur un biofilm du sol, généré de manière artificielle pendant 5 jours en usine agroalimentaire, le pourcentage de surface contaminée passe de 98,4 % à 82,7%, alors qu'après application d'un jet haute pression, ce pourcentage est réduit à 0,1%.

Une autre étude, effectuée en laboratoire, a tenté de se rapprocher des conditions industrielles en tenant compte des carences en nutriments et de la compétition microbienne. Ces facteurs influencent aussi la diminution de la population de *L. monocytogenes* : lorsque *L. monocytogenes* est introduite dans un biofilm mixte de 9 jours comprenant des bactéries Gram+, soumis quotidiennement à un nettoyant-désinfectant (produit alcalin chloré) avec pour milieu nutritif du lactosérum, la population de *L. monocytogenes* subit 4 réductions décimales, après une première opération d'hygiène. Après 6 jours de présence dans ce biofilm, la population de *L. monocytogenes* ne subit plus que 2 réductions décimales, suite à une seconde opération d'hygiène. Lorsque le milieu nutritif est TSB-YE, ces valeurs deviennent respectivement 1,5 et 1 (Leriche, 1999a).

Outre la réduction de la population microbienne des surfaces, ces techniques de nettoyage et désinfection, permettant l'élimination des bactéries adhérentes de la surface, provoque la dissémination des bactéries dans l'environnement par l'intermédiaire des aérosols (Frank et al., 2003; Mettler and Carpentier, 1998). Des

études sont d'ailleurs menées pour évaluer l'efficacité d'agents chimiques appliqués sous forme de gel afin d'éviter cette dispersion (Frank et al., 2003). Cependant, aucune étude à notre connaissance ne permet la quantification de la dispersion des cellules suite aux opérations d'hygiène.

A défaut, quelques auteurs ont observé l'impact des agents nettoyants sur l'organisation spatiale des cellules sur les surfaces avant et après application d'agents chimiques. Deux d'entre elles aboutissent à la conclusion suivante : après application de l'agent chimique (nettoyage et/ou désinfection), les micro-colonies initialement présentes dans le biofilm disparaissent et la population est alors composée principalement de cellules isolées adhérentes (Bremer et al., 2006). Cette observation est confirmée par (Midelet and Carpentier, 2004), après utilisation d'un alcalin chloré et par (Jessen and Lammert, 2003) qui observent la répartition des concentrations en cellules aérobies après désinfection : en fonction du désinfectant utilisé, entre 71 et 89% des échantillons présentent une concentration inférieure à 10 CFU/cm<sup>2</sup>, le reste des échantillons présentant des concentration entre 10 et 10000 CFU/cm<sup>2</sup>. Une désinfection supplémentaire donne des résultats mitigés en termes d'efficacité. Les auteurs observent une diminution des concentrations extrêmes et une augmentation des concentrations intermédiaires. Cependant, les résultats de cette étude restent difficilement interprétables puisque la répartition des concentrations avant la première désinfection n'est pas fournie. Globalement on peut tout de même conclure à la disparition des colonies de grande taille après les opérations d'hygiène.

Cette étude bibliographique montre que de multiples paramètres interviennent dans le mécanisme de réduction de la population dû aux opérations d'hygiène, suggérant sa difficile modélisation.

### **III. Proposition d'une méthodologie de modélisation**

Nous proposons dans ce paragraphe une structure de modélisation pour le niveau de contamination d'un élément solide, unité de production ou surface de l'environnement. Cette proposition s'inspire des observations et résultats de la présente revue bibliographique, tant du point de vue de la modélisation que du point de vue de la microbiologie.

Dans un premier temps, nous présentons les exigences relatives à un modèle d'appréciation de l'exposition tenant compte des contaminations secondaires, puis nous proposons la structure de modélisation. Enfin, nous listons les hypothèses nécessaires à l'utilisation de la structure proposée.

#### **A. Exigences du modèle**

##### **1) Echelles de temps et d'espace multiples**

Dans un modèle d'appréciation de l'exposition d'un produit alimentaire à un danger microbien, l'ensemble des étapes du procédé de fabrication doit être intégré. Pour chaque étape, les phénomènes ayant pour conséquence l'évolution des charges microbiennes (paragraphe I et II du présent chapitre) sont susceptibles de se produire et de se dérouler sur différentes échelles de temps. De plus, les compartiments et unités de production sont différents d'une étape à l'autre. Ainsi, il s'agit de construire un modèle dont la structure est adaptable aux différentes échelles de temps et d'espace de l'ensemble du procédé de fabrication.

## **2) Modélisation conjointe de la prévalence et de la concentration**

Les phénomènes de contamination secondaires, liés au transfert des microorganismes entre compartiments, et ceux relatifs au comportement microbien en fonction des conditions physico-chimiques environnementales ont un impact direct sur la prévalence et la concentration de la population microbienne dans les unités de production. Ces valeurs évoluent au cours du temps de manière interactive, ce dont le modèle doit tenir compte.

## **3) Prise en compte de l'organisation spatiale des cellules en milieu solide**

Les éléments impliqués dans la dynamique de contamination sont principalement des milieux solides, inertes ou non, sur lesquels les bactéries en présence ont la possibilité de se multiplier, notamment sous forme d'agrégats. Dans ce contexte, les paramètres et la structure du modèle doivent être adaptés à l'organisation spatiale des cellules en milieu solide.

## **4) Historique de l'état physiologique des cellules**

Les phénomènes de contaminations secondaires impliquent le transfert des microorganismes d'un compartiment de départ vers un compartiment d'arrivée, et par conséquent, la modification des conditions environnementales physico-chimiques dans lesquelles ils sont placés au cours du temps. Or, l'état physiologique des cellules dans le compartiment d'arrivée dépend des nouvelles conditions environnementales et de leur état physiologique dans le compartiment de départ. Ainsi, le modèle proposé doit tenir compte de l'historique des cellules pour modéliser leur état physiologique.

# **B. Stratégie de modélisation**

La stratégie de modélisation proposée s'applique aux éléments solides (surfaces de l'environnement ou unités de production solides). Elle consiste à modéliser le niveau de contamination de l'élément selon la structure suivante :

Soit l'étape E du procédé de fabrication et un élément C de cette étape.

Le niveau de contamination de l'élément C est défini à l'instant t par une matrice  $M(t)$  de taille  $N \times 2$ , où  $N \in \mathbb{N}$  est le nombre de colonies présentes dans l'élément.

La  $i^{\text{ème}}$  ligne de la matrice  $M(t)$  caractérise la colonie de rang i de l'élément C selon un couple de valeurs  $(T, Q) \in \mathbb{N} \times [0; \infty[$  à l'instant t avec :

- $T \in \mathbb{N}$  est la taille de la colonie définie par le nombre de cellules viables dans la colonie.
- $Q \in [0; \infty[$  est la quantité de travail à accomplir par les cellules constituant la colonie avant la phase exponentielle.

Le suivi au cours du temps d'une telle structure pour chacun des éléments d'une étape, impliqués, soit dans l'un des phénomènes de contaminations secondaires, soit dans les phénomènes liés aux conditions environnementales, permet de répondre aux exigences du modèle évoquées ci-dessus, sous les hypothèses suivantes.

## C. Hypothèses de modélisation

### 1) Relatives à la structure des cellules

En milieu solide, nous faisons l'hypothèse que les bactéries en phase de croissance se multiplient sous forme d'agrégats (Thomas et al., 1997), appelés *colonies*. Ainsi, les cellules filles sont à proximité des cellules mères. La proximité des cellules d'une même colonie implique que ces cellules sont dans un état physiologique similaire et subissent les mêmes conditions physico-chimiques environnementales au même instant.

### 2) Relatives au transfert des cellules

Lors d'un contact d'une surface contaminée (présence de colonies) avec une autre surface non contaminée, les cellules d'une colonie sont transférées partiellement ou dans leur totalité, en fonction de la capacité d'adhésion des cellules à la surface d'origine. Deux cas de figures se présentent : la recontamination, supposant des cellules présentes sur une surface inerte de l'environnement, adhérentes ou non, et la contamination croisée supposant des cellules présentes à la surface d'un ou plusieurs produits.

Dans le premier cas, l'adhésion dépend de la surface considérée et des conditions environnementales. Si les cellules sont en conditions favorables à l'adhésion, une proportion des cellules de la colonie est transférée selon un taux de transfert prédéfini. Le transfert partiel de la colonie implique sa diminution en taille sur la surface d'origine. C'est par exemple le cas d'une colonie présente sur une surface depuis plusieurs jours, tel

que les sols de hâloir. Si par contre les conditions sont défavorables à l'adhésion, la colonie est transférée dans sa totalité comme dans le cas d'une colonie de bactéries présente sur une machine en acier inoxydable régulièrement nettoyée (Midelet and Carpentier, 2004). Dans les deux cas, les colonies d'un même compartiment ont la même probabilité d'être transférées selon le même taux de transfert.

Dans le deuxième cas, les colonies de cellules sont présentes à la surface du produit. Le transfert des colonies se produit par l'intermédiaire du transfert de matière présente à la surface du produit, suite à un contact. En fonction du type de contact, les colonies peuvent être transférées dans leur totalité ou partiellement, en fonction du procédé.

### **3) Relatives à l'état physiologique des cellules**

Comme décrit précédemment, les cellules d'une même colonie sont dans un état physiologique similaire et subissent les mêmes conditions physico-chimiques environnementales, favorables à la croissance, ou impliquant la destruction des cellules.

Concernant la croissance, les cellules d'une même colonie sont considérées comme viables et capables de croître. De plus elles sont supposées constituer un inoculum dont l'ensemble des bactéries est viable si les conditions de croissance sont favorables (Peneau et al., 2007). Dans ce cadre, l'application des modèles et paramètres de croissance à des colonies s'avère possible. Lorsqu'une colonie a atteint sa taille maximale, la croissance s'arrête. Enfin, on suppose que le nombre de colonies dans un compartiment est assez faible pour ne pas être confronté au problème des interactions spatiales entre colonies d'un même compartiment.

Concernant la phase de latence, l'hypothèse est faite que les stress environnementaux s'appliquent à toutes les cellules d'un même compartiment et à toutes les cellules d'une même colonie. Le stress environnemental induit une réduction de la population microbienne dans un premier temps. Dans un second temps, les cellules survivantes de la colonie entrent dans une phase de latence. Bien que l'ampleur de cette phase de latence présente une grande variabilité d'une cellule à l'autre, la quantité de travail à accomplir appliquée est la même pour chaque cellule d'une même colonie. En effet, il a été montré que la variabilité de la latence au niveau individuel a peu d'impact sur un modèle d'exposition au risque général (Francois et al., 2006). De plus, la phase exponentielle de croissance suppose que les cellules d'une colonie sont dans un même état physiologique.

Enfin, la succession de stress environnementaux n'ayant pas été évaluée expérimentalement, excepté pour quelques scénarios, l'hypothèse est faite que l'application d'un stress annule l'effet d'un stress précédent.

Concernant la réduction de la population microbienne d'un compartiment suite aux mesures d'hygiène, les agents chimiques sont supposés pouvoir atteindre l'ensemble des cellules d'une colonie. Ainsi la taille d'une colonie est réduite d'un certain nombre de réductions décimales lors d'une opération d'hygiène. Les colonies d'un même compartiment ayant des capacités de résistances aux agents chimiques différentes (dépendant de leur historique), le nombre de réductions décimales appliqué est un nombre moyen appliqué à toutes les colonies d'un même compartiment.



### *Conclusion du chapitre*

Dans ce chapitre, nous avons, dans un premier temps, cherché à identifier les phénomènes participant à la dynamique de la contamination microbienne en industrie agroalimentaire. Ces phénomènes se répartissent en deux catégories, mais interagissent pour finalement avoir un impact commun sur l'évolution de la prévalence et de la concentration en microorganismes des unités de production au cours du temps et sur la contamination de l'environnement.

(Nauta, 2001) avait répertorié six processus, classés dans les deux mêmes classes de phénomènes que dans la présente revue : les phénomènes relatifs au comportement microbien (croissance et inactivation) et ceux relatifs à la manipulation des aliments (mélange, partitionnement, contamination croisée et suppression). Les phénomènes tels qu'ils sont décrits dans ce rapport ne s'appliquent qu'à la présence des bactéries dans les unités de production et non dans l'environnement, comme c'est le cas dans la présente revue bibliographique. Concernant les phénomènes relatifs à la manipulation des aliments, nous avons choisi de ne pas considérer les phénomènes de « mélange » et de « partitionnement » dans la présente revue (Nauta, 2005; Reinders et al., 2003; Toft et al., 2006), considérant que ces phénomènes n'ont pas d'influence sur la prévalence et la concentration des unités de production, et que la variation de ces derniers est due à un changement d'échelle des unités de production.

En termes de modélisation, l'état de l'art dépend du phénomène considéré. Ainsi, les modèles de croissance dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle fournissent aujourd'hui des résultats relativement fiables. Par contre les modèles proposés pour la contamination des surfaces inertes (modélisation des biofilms) ne sont pour l'instant pas adaptés à un modèle d'appréciation de l'exposition. Enfin nous avons constaté que dans le cadre des modèles relatifs au transfert des microorganismes (contamination croisée et recontamination), l'estimation des paramètres des modèles n'était généralement pas couplée à la construction des modèles. Par conséquent, les valeurs des paramètres obtenues au cours de plans expérimentaux spécifiques sont difficilement adaptables à de nouveaux contextes.

A l'issue de la revue bibliographique, nous proposons une stratégie de modélisation pour l'intégration de ces phénomènes et leurs interactions dans un modèle d'appréciation de l'exposition : il s'agit de suivre au cours du temps, lui même agencé selon plusieurs échelles de temps, l'évolution du niveau de contamination de chaque compartiment d'une étape, incluant unités de production et surfaces de l'environnement. La structure proposée s'adapte à l'ensemble du procédé de fabrication et aux différentes échelles de temps et d'espaces, sous certaines hypothèses.

Des approches de modélisation des phénomènes de transfert au sein de modèles d'appréciation de l'exposition à un danger microbien ont déjà été proposées : (Gallagher et al., 2003; Nauta et al., 2005b). Dans

la première étude, les auteurs se sont affranchis de la question de la répartition des bactéries contaminantes à l'intérieur du lot en modélisant l'évolution du nombre total de cellules dans le lot, ignorant ainsi le phénomène de contamination croisée. Lors de l'application de la relation dose-réponse pour le calcul du risque de listériose, le nombre final de cellules présentes dans le lot est divisé par le nombre d'unités de production du lot, supposant une répartition homogène des cellules dans le lot. Or la contamination croisée implique une répartition des cellules entre les produits d'un même ensemble de produits. Dans la seconde étude, les auteurs considèrent simplement une répartition homogène des cellules dans l'environnement et dans les unités de production, la croissance de l'espèce considérée dans ces compartiments étant nulle. La structure que nous proposons a pour avantage de tenir compte de l'interaction entre les phénomènes et de l'organisation spatiale des cellules dans les différents compartiments, résultant de la croissance.

Dans ce contexte, la suite de l'étude se divise en deux parties : un premier travail vise à approfondir la problématique des modèles de contamination secondaire et l'estimation de leurs paramètres. En effet, les paramètres de transfert correspondent, dans les études publiées, à des proportions de cellules transférées, mais ne sont pas adaptés à des modèles d'appréciation de l'exposition visant à intégrer les phénomènes de contaminations secondaires. Ainsi, nous proposons dans le cadre d'une application à un procédé agro-industriel spécifique - l'étape de soins des fromages à pâte molle pendant l'affinage -, une approche de modélisation de la contamination croisée basée sur le transfert de biomasse entre unités de production. Deux modèles distincts sont proposés pour deux procédés de soins différents, ainsi que les expérimentations en conditions industrielles ayant permis l'estimation de leurs paramètres.

Dans une seconde partie nous proposons l'intégration d'un de ces modèles dans un modèle d'appréciation de l'exposition des fromages à pâte molle au lait pasteurisé à *L. monocytogenes*. L'approche vise deux objectifs : (1) une contribution méthodologique aux modèles d'appréciation de l'exposition, notamment à travers l'application de la structure de modélisation proposée ; (2) l'utilisation d'un tel modèle en tant qu'outil de maîtrise des dangers microbiologiques par les acteurs de l'industrie agroalimentaire.



# CHAPITRE IV

## Modélisation de la Contamination Croisée induite par les Soins des Fromages en Cours d’Affinage

Au cours de l’affinage, les fromages font l’objet de soins pendant lesquels ils sont frottés avec une solution pouvant contenir des ferments, des levures. Les soins s’opèrent, soit manuellement, soit mécaniquement par l’intermédiaire d’une brosse. Cette étape présente un risque en termes de contamination croisée. En effet, un fromage contaminé en surface peut contaminer d’autres fromages par l’intermédiaire de la main (soins manuels) ou de la brosse (soins mécaniques). Pour quantifier le phénomène de contamination croisée, nous avons modélisé la dynamique de dispersion pendant les soins de la charge bactérienne d’un fromage contaminé en surface.

Pour chacun des deux types de soins, manuels et mécaniques, nous avons construit un modèle compartimental, dynamique et stochastique. Les paramètres de transfert des modèles ont été estimés, suite à des expériences en usines. Ces paramètres suivent une loi de distribution empirique résumant leur variabilité et l’incertitude liée aux données.

A l’issue des simulations utilisant l’estimation de ces paramètres, nous observons, pour un scénario donné, le nombre de fromages contaminés à partir d’un fromage (concentration initiale connue), la concentration des fromages contaminés en fonction de leur ordre de passage. Il est alors possible d’évaluer l’influence de la fréquence des mesures d’hygiène et de la variabilité des paramètres, sur le phénomène de contamination croisée.

## I. Soins mécaniques

L'étude conduite sur la modélisation de la contamination croisée induite par les soins mécaniques des fromages en cours d'affinage a fait l'objet d'un article publié dans la revue internationale à comité de lecture « Risk Analysis », en 2006 : *Stochastic, compartmental and dynamic modeling of cross-contamination during mechanical smearing of cheeses. Risk Analysis Vol 23, issue 3 pages 731-745. Fanny AZIZA, Eric METTLER, Jean-Jacques DAUDIN, Moez SANAA*. L'intégralité de l'article est reportée dans cette partie de la thèse, en anglais.

### A. Résumé

Cheese smearing is a complex process and the potential for cross-contamination with pathogenic or undesirable microorganisms is critical. During ripening, cheeses are salted and washed with brine to develop flavor and remove moulds that could develop on the surfaces. Considering the potential for cross-contamination of this process in quantitative risk assessments could contribute to a better understanding of this phenomenon and, eventually, improve its control.

The purpose of this paper is to model the cross-contamination of smear-ripened cheeses caused by the smearing operation under industrial conditions. A compartmental, dynamic and stochastic model is proposed for mechanical brush-smearing. This model has been developed to describe the exchange of microorganisms between compartments. Based on the analytical solution of the model equations and on experimental data collected with an industrial smearing machine, we assessed the values of the transfer parameters of the model. Monte Carlo simulations, using the distributions of transfer parameters, provide the final number of contaminated products in a batch and their final level of contamination for a given scenario taking into account the initial number of contaminated cheeses of the batch and their contaminant load. Based on analytical results, the model provides indicators for smearing efficiency and propensity of the process for cross-contamination. Unlike traditional approaches in mechanistic models, our approach captures the variability and uncertainty inherent in the process and the experimental data. More generally, this model could represent a generic base to use in modeling similar processes prone to cross-contamination.

**Keywords:** cross-contamination, modeling, cheese smearing, Monte Carlo simulations.

## B. Article

### INTRODUCTION

At regular intervals during ripening, the surface of smear-ripened cheeses are salted and washed with brine containing fermenting microorganisms and sometimes alcohol (smearing solution). This is specifically to enhance the organoleptic development of the product (Corsetti et al., 2001) and to remove the undesirable moulds that can develop on the surface of the cheeses. The smearing operation is carried out either manually or mechanically and causes indirect contact between cheeses via hands or brush-smearing machine. The potential for cross-contamination, defined in this paper as the transfer of microorganisms from one product to another caused by direct or indirect contact, is therefore high when undesirable microorganisms are present in one or more cheeses. In the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) context, this processing step has been qualitatively identified as a step where products can be contaminated.

Several outbreaks of listeriosis have been attributed to the consumption of soft cheeses contaminated by *L. monocytogenes* (Lunden et al., 2004). Smear-ripened cheeses have been implicated in at least four such cases (Anonymous, 2003b; Bula et al., 1995; Goulet et al., 2001; Jacquet, 1998). Moreover, Rudolf et al. observed that 15.8% of European smear-ripened cheese samples of various types contained microorganisms of the genus *Listeria* (Rudolf and Scherer, 2001). In this situation, quantitative risk assessment (QRA) models of human listeriosis linked to consumption of soft cheese made from raw milk were conducted (Bemrah et al., 1998; Sanaa et al., 2004). The models developed assess the prevalence and concentration of *L. monocytogenes* in cheeses throughout the various steps of production from farm to table. Only contamination arising from the raw milk was taken into account. Indeed, it was assumed that for the type of cheese studied, white-rind soft cheeses made with raw milk (notably Camembert and Brie de Meaux), the impact of cross-contamination was negligible when good manufacturing procedures and HACCP were observed since contamination of these cheeses is almost exclusively localized in their core. However, in contrast with raw milk products, the safety of soft cheeses made with pasteurized milk is more concerned with cross-contamination since contamination of the product surface can occur during both processing and maturation. Operations such as deliberate smearing of cheese surfaces increase the risk of undesirable microorganisms being present on the product surfaces. Taking such operations into account would significantly alter the results of any quantitative risk assessment of pathogens in such cheeses made with raw or pasteurized milk. Finally, using quantitative risk assessment to quantify the potential for cross-contamination of this process, offers a means of overcoming limitations of qualitative HACCP identification (Buchanan and Whiting, 1998).

Among the six basic processes defined by Nauta in the modular process risk model (Nauta, 2001), cross-contamination is one of the most complex and relatively few quantitative studies have addressed it. This paper presents a compartmental modeling approach of the mechanical brush-smearing operation. The model assesses the prevalence and concentration of undesirable microorganisms on smear-ripened cheeses after the

smearing step for a given scenario of the initial contamination of a batch. The transfer parameters were derived from experiments conducted with an industrial brush-smearing machine. Monte Carlo simulations were used to quantify the impact of brushing on cross-contamination. Our approach is designed to capture variability and uncertainty arising respectively from the process itself and from transfer parameter distributions.

## MATERIAL AND METHODS

The model describes the transfer of microorganisms between cheeses, the machine and the environment of the machine. It is a system of discrete deterministic difference equations. Parameters of the equations are based on physical phenomenon, making the model mechanistic (den Aantrekker et al., 2003a; Nauta et al., 2005b). To obtain values on parameters of the model, we conducted experiments under industrial conditions. As experimental data collected were dependant on measurement error and repetitions, we revised these data using Monte Carlo simulations and obtained empirical distributions for transfer parameters. Equations of the model and transfer parameter distributions could then be applied to any potential undesirable microorganism present on the surface of the cheeses. All calculations were performed with MATLAB® Version 6.5 Release 13.

### Fundamental concept of the model

The fundamental concept of the model is the description of biomass transfer between cheeses, brush-smearing machine and environment. Biomass is made up of organic matter and microorganisms, notably industrial culture strains added during manufacture. In the smearing machine, some biomass is transferred from the surface of the cheese to the machine and a fraction of it can be transferred to the following cheeses and to the environment.

Some pathogenic microorganisms (e.g. *L. monocytogenes*) or spoilage microorganisms (e.g. moulds) may be sporadically present in the biomass on the surface of the product. Assuming that low levels of these undesirable microorganisms are homogeneously present throughout the biomass, their transfer through brushing can then be estimated by the transfer of biomass. Hence, if the proportion of biomass transferred from one compartment to another is equal to  $p$  ( $p \in [0,1]$ ), then the proportion of undesirable microorganisms transferred is also equal to  $p$ . The aim of the experiments therefore was to assess parameters of the model with a cheese for which the main industrial culture strain constituting the biomass could be quantified. These parameters can then be applied to any potential population of undesirable microorganisms present among the biomass.

## Experimental data collection

In this study we used smear-ripened cheeses made from pasteurized milk from the North of France. The cheese dimensions are 8 x 8 x 4 cm and its weight is 200 grams. Manufacture and ripening of this cheese under regular industrial conditions consist of the following steps: the industrial culture strain *Brevibacterium linens* BL1, a coryneform bacteria that contributes to the yellow-red stain of the rind, is inoculated into the milk ( $10^{4.7}$  CFU/ml). This bacteria is the main component of the cheese surface. Next, at regular stages during ripening (5, 9, 14, 17 days), cheeses are transported on a conveyor belt and are brushed mechanically with a smearing solution in the brush-smearing machine. During the first two smearing operations (5 and 9 days), BL1 is also added to the smearing solution ( $10^{7.6}$  CFU/ml).

For the experiments, two groups of cheeses were manufactured. Manufacture and ripening of the experimental cheeses were carried out under regular industrial conditions, as described above. Cheeses from the first group (called “CBL1s”) were manufactured with the standard industrial culture strain, *Brevibacterium linens* BL1, whereas cheeses from the second group (called “CBL2s”) were manufactured with another strain of *Brevibacterium linens*, BL2 instead of BL1. Previous studies (unpublished data) have shown that both BL1 and BL2 strains have the same growth rate on the surface of the cheese and that BL2 colonies are easily distinguishable from BL1 colonies. As *Brevibacterium linens* bacteria is one of the main components of the biomass of the cheese surface, transfer of biomass was thus observed through this bacteria. The particular strain BL2 was used as a marker in quantifying transfer parameters.

The experiments were carried out using 17-day-old cheeses. The machine was cleaned (closed circuit) and the brushes were disinfected prior to use industrial techniques. Five times in a row during a processing run, one CBL2 followed by 30 CBL1s were submitted to the smearing step. The first cheese (CBL2) to pass through the clean machine was collected to measure the residual population of BL2 on its surface. For each of the five series, four CBL1s from the first six CBL1s following the CBL2 were collected and the transferred populations of BL2 were measured. Before brush-smearing, three CBL2s were used to assess the initial BL2 population of CBL2s.

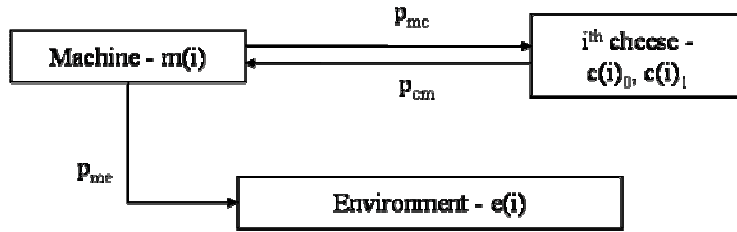
The microbial analysis of the cheese surface was carried out by removing the whole biomass with a spatula. This biomass was decimally diluted in a sterile stomacher bag and the resulting suspension was homogenized in a stomacher blend for 2 min. An appropriate dilution of the suspension was plated on Brain Heart Infusion Agar (Difco) containing 50 g of NaCl per liter supplemented with pimaricin (200 ppm), nalidixic acid (40 ppm) and furazolidone (10 ppm) to inhibit yeasts, Gram-negative bacteria and staphylococci, respectively. Plates were incubated at 20°C for 15 days in order to improve the pigment formation of the colonies. The developing population was constituted by coryneform bacteria, including BL1 and BL2. Specific counts of BL2 were determined using the specific red color of the colonies and were expressed in colony forming units (CFU) per cheese surface.



After the treatment of the five series, the inside surface of the bottom of the machine under the conveyor belt was cleaned and an additional series of 30 CBL2s was treated. Afterwards, the surfaces of the brushes and the conveyor belt were swabbed with sterile sponges. The inside surface of the bottom of the machine under the conveyor belt surface was considered as the main part of the neighboring environment of the machine and was therefore also swabbed. The sponges were then immersed in 20 ml of Quarter's Strength Ringer<sup>TM</sup> solution (AES, Combourg, France) and the resulting suspension was homogenized in a stomacher blend for 2 minutes. The suspension was analyzed as described above to enumerate BL2 population.

### Deterministic and compartmental model for cross-contamination during cheese brush-smearing

A transfer of biomass takes place between three compartments: the *machine*, the neighbouring *environment*, and the *cheese* surface (Figure 24). It occurs because of cheese-contact surfaces or because of brine conveying biomass through the machine. Biomass can be transferred from the *cheese* surface to the *machine* by the brushes and/or the conveyor. Such transfer can take place on cheese-contact surfaces, at points of direct contact with mechanical devices (brushes, conveyor) or through indirect contact (inner walls of the machine). The biomass can then be deposited on the following *cheese* surfaces by the *machine*. Finally, some biomass can be transferred from the *machine* to the neighbouring *environment*: a part of this biomass is recovered on the inside surface at the bottom of the machine under the conveyor belt where brine flows; the other part goes onto the floor around the machine. It is assumed that the biomass does not go back into the *cheese/machine* sub-system from the neighbouring *environment*.



**Figure 24** Cross-contamination model. Biomass is transferred between the machine, the cheese being treated, and the neighbouring environment.  $p_{kl}$  is the proportion of biomass transferred from compartment  $k$  to compartment  $l$ . ( $k, l$ , standing for “machine”, “cheese” and “environment” respectively).  $m(i)$  and  $e(i)$  are the number of CFU on the machine and in the neighbouring environment, respectively, after the cheese with rank  $i$  was treated. The cheese with rank  $i$  has two states:  $c(i)0$  and  $c(i)1$ , i.e. the number of CFU before and after brush-smearing, respectively.

The cross-contamination model is a set of three deterministic discrete difference equations, system (S) below, formulating the number of CFU of undesirable microorganisms present in each compartment after brush-smearing of the cheese with rank  $i$  (the rank of the  $i^{\text{th}}$  cheese of a batch is “ $i$ ”). The population of a compartment after brush-smearing of the cheese with rank  $i$  depends on: (1) the population of the

compartments after brush-smearing of the cheese with rank (i-1) and (2) the population of the cheese i before brush-smearing. Transfer parameters of the model are the proportion of biomass transferred from one compartment to another which were assessed using the *Brevibacterium linens* population as an indicator for biomass of the cheese surface.

$$(S) \begin{cases} m(0) = e(0) = 0 \\ m(i) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(i-1) + p_{cm} \times c(i)_0, i \geq 1 \\ e(i) = e(i-1) + p_{me} \times m(i-1), i \geq 1 \\ c(i)_1 = (1 - p_{cm}) \times c(i)_0 + p_{mc} \times m(i-1), i \geq 1 \\ 0 < p_{cm}, p_{mc}, p_{me} < 1; p_{mc} + p_{me} < 1 \end{cases}$$

$m(i)$  and  $e(i)$  are respectively the numbers of CFU on the machine and in the neighboring environment after the cheese with rank  $i$  is brushed. The cheese with rank  $i$  has two states:  $c(i)_0$  and  $c(i)_1$ , respectively the numbers of CFU on its surface before and after brushing. For  $i \geq 1$ ,  $c(i)_0$  are the input of the model and  $c(i)_1$  are the outputs of the system (S).  $p_{cm}$  is the proportion of biomass transferred from the *cheese* to the *machine*,  $p_{mc}$  is the proportion of biomass transferred from the *machine* to the *cheese* and  $p_{me}$  is the proportion of biomass transferred from the machine to the environment.

At the beginning, both machine and environment are clean so that  $m(0) = e(0) = 0$ . Constraints are: (1) parameters are the proportions of biomass transferred and must therefore be between 0 and 1, and (2)  $p_{mc} + p_{me} < 1$ , if not, the machine could transfer more CFU than it contains.

## Model analysis

Based on the equations of the system (S), we obtained an analytical solution (eq. (1), (2), (3) and (4)) for the set of parameters ( $p_{cm}$ ,  $p_{me}$ ,  $p_{mc}$ ) for the following scenario: before smearing, only the first cheese of a batch carries some CFU on its surface, and, after smearing, the following cheeses are contaminated (cross-contaminated cheeses) because of the first cheese and, thus, can carry some CFU on their surface (if  $i=1$ ,  $c(i)_0 > 0$ , otherwise,  $c(i)_0 = 0$  but  $c(i)_1$  might be positive). This scenario fits that of the experiments performed: the BL2 population of CBL2s represents a marker of the cheese biomass; it is quantified in CFU; the first cheese of each series is manufactured with BL2, instead of BL1. Applying the analytical solution to the BL2 population thus made it possible to assess the transfer parameters of the model.

Demonstration of the following expressions is detailed in appendix A<sup>1</sup> (paragraph III).

---

<sup>1</sup> Each evocation of the logarithm (with « logarithm » or « log ») in the following text corresponds to the decimal logarithm.

$$(S') \begin{cases} p_{cm} = 1 - 10^{\log(c(i)_1) - \log(c(i)_0)} & (1) \\ p_{mc} = 10^{A - \log(p_{cm} \times c(i)_0) + 2B} & (2) \text{ and } \log(c(i)_1) = A + i \times B, i \geq 2 & (4) \\ p_{me} = 1 - 10^B - p_{mc} & (3) \end{cases}$$

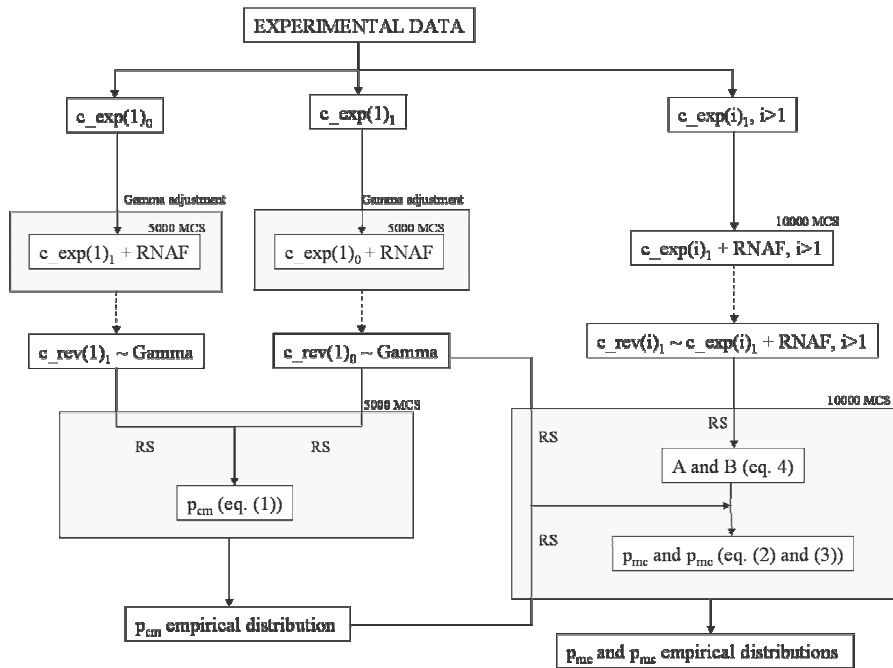
Eq. (4) makes it possible to obtain values on parameters A and B by means of a linear regression (least square fitting) between  $\log(c(i)_1)$  and  $i$ , as if  $i$  were a continuous variable and for  $i \geq 2$ . Eq. (1) makes it possible to assess  $p_{cm}$ . Finally, eq. (2) and (3) provides values of  $p_{me}$  and  $p_{mc}$ .

### Monte Carlo simulations for transfer parameters estimation

The experimental data displayed two sources of variation. The first one was uncertainty on BL2 counts, assumed to be normally distributed on a logarithmic scale. As measurement error was taken to be  $\pm 0.3 \log$  CFU (Mettler, E., communication personnelle), the mean and the standard deviation of the uncertainty distribution were respectively 0 and 0.15  $\log$  CFU. To take this measurement error into account, we ran Monte Carlo simulations to generate new sets of data based on experimental data corrected with a Random Normal Additive Factor with mean 0 and standard deviation 0.15 (RNAF).

The second source of variation came from the variability of the initial BL2 population of CBL2s before brush-smearing. A gamma distribution, also corrected with RNAF, adequately matched these data. The same procedure was applied to the BL2 count of the first CBL2 brushed corrected with RNAF.

The parameter assessment procedure is detailed in Figure 25. “c\_exp” data stands for experimental data; “c\_rev” data stands for revised data (correction with RNAF and, depending on the data, gamma adjustment). Eq. (4) was adjusted on revised data for  $i \geq 2$ , providing values on A and B. Eq. (1) was applied to revised data for  $i = 1$  and made it possible to assess the transfer parameter  $p_{cm}$ . Finally, eq. (2) and (3), which requires values for previously assessed  $p_{cm}$  and  $c(i)_0$ , made it possible to calculate  $p_{mc}$  and  $p_{me}$ . Monte Carlo simulations provided empirical distributions on transfer parameters of the model that we chose not to parameterize. Finally, Pearson’s correlation coefficients between the empirical distributions of parameters were calculated.



**Figure 25 Parameters estimation procedure.** Experimental data (“c\_exp”) are corrected to take uncertainty and variability arising from the experiments into account, resulting in revised data (“c\_rev”). Using Monte Carlo simulations (MCS), analytical solution of system (S) is adjusted on random sample (RS) from the distributions obtained on revised data, thus making it possible to assess transfer parameter values.

### Simulating cross-contamination for specific scenarios

Simulating cross-contamination processes requires a given scenario describing the type of initial contamination of the batch studied: the number of cheeses brushed between two cleanings (NR), the number of contaminated cheeses (N), their rank in the batch (R), and their contaminant load (C), i.e. the number of CFU of the undesirable microorganisms spread in the biomass of the surface of the contaminated cheeses.

To establish the impact of smearing on cross-contamination, we observed results for two different recontamination scenarios likely to occur (den Aantrekker et al., 2003a; Tompkin, 2002). The first scenario (scenario S1) is a sporadic contamination of the batch with a pathogenic microorganism: the environment contaminated the surface of one product of the batch (recontamination with water droplets, for instance). The second scenario (scenario S2) is a batch homogeneously contaminated with moulds: all cheeses are contaminated with the same contaminant load on cheeses. This situation may arise because of a recontamination of the product at the beginning of processing (recontamination of coagulated milk during moulding or milk contaminated because of faulty pasteurization).

For scenarios S1 and S2 we chose the contaminant load  $C=300$  CFU/cheese (2,48 log CFU/cheese). Finally, characteristics for scenarios S1 and S2 were  $\{N=1, NR=2000, C=300, R=10\}$  and  $\{N=NR=2000, C=300, R=[1,N]\}$ , respectively. After each batch had been brushed, outputs were the new prevalence and the new allocation of CFU on the cheese surfaces.

Simulations can be implemented deterministically using system (S) (or using eq. (4) for S1) with one set of parameters (after each transfer, the number of CFU transferred must be rounded to the nearest integer). They can also be implemented stochastically using random sets of parameters from their assessed empirical distribution and applying a Binomial distribution to the number of CFU transferred from one compartment to another. Indeed, the transfer of a CFU from one compartment to another can be considered as an event occurring with a probability  $p$ ,  $p$  being the proportion of biomass transferred from one compartment to another. The random variable, equal to 1 if the CFU is transferred, and to 0 otherwise, follows a Bernoulli distribution with parameter  $p$ . The sum of  $n$  independent random variables following a Bernoulli distribution with parameter  $p$  follows a Binomial distribution with parameters  $n$  and  $p$ . As the CFU of a compartment are independent, the number of CFU transferred follows a Binomial distribution, the parameters of which are the initial number of CFU in the first compartment and the transfer parameter  $p$ . The Binomial process, applied each time a transfer of CFU occurs, makes the model stochastic.

To compare results from the theoretical model and the experiments, we also simulated the scenario of the experiments conducted. Five hundred simulations of the following scenario were performed: five series of one CBL2 each followed by 30 CBL1s were treated in the machine. After these five series, the neighboring environment was cleaned (after the 35<sup>th</sup> cheese, the environment was put to 0, i.e.  $e(35)=0$ ) and 30 CBL2s were then treated in the machine. We compared experimental and simulated results: after the five series for the machine contamination, and after the five series and the 30 CBL2s for the environment contamination.

### Analytical results for cross-contamination

Using the analytical solution of the model, we derived the number of contaminated cheeses after brush-smearing as a function of the transfer parameters ( $p_{cm}$ ,  $p_{me}$ ,  $p_{mc}$ ) and the contaminant load  $C$ . This solution was calculated for a scenario S1, where the first cheese of a batch is contaminated with  $C$  CFU ( $R=1$ ). When the first cheese of the batch is initially contaminated with  $C$  CFU, the last cross-contaminated cheese ( $i = I$ ) has got the lowest number of CFU on its surface. This number is greater than one, thus,  $I \in \{i \geq 2 / c(i)_1 \geq 1\}$ , i.e.  $I \in \{i \geq 2 / \log(c(i)_1) \geq 0\}$ . According to eq. (4), which provides the contaminant load of cheeses with rank  $i \geq 2$ ,  $I \in \{i \geq 2 / A + iB \geq 0\}$ .  $f(i) = A + iB$  being a monotone decreasing function for  $i \geq 2$  ( $B < 0$ , since  $1 - p_{me} - p_{mc} < 0$ ), the minimum of this function is solution of  $\{i \geq 2 / A + iB = 0\}$ .  $I$  being the rank of the last cross-contaminated cheese, it is also equal to the total number of cross-contaminated cheeses issuing from one initially contaminated with  $C$  CFU (see appendix B in paragraph III for details).

$$I = 2 - \frac{\log(p_{mc} \times p_{cm} \times C)}{\log(1 - p_{mc} - p_{me})} \quad (5)$$

For the same scenario, the ratio  $J = \frac{\max_{i \geq 1}(c(i)_1)}{c(1)_0}$  stands for the maximum proportion of the contaminant load observed on contaminated cheeses compared to the initial contaminant load  $C$ . As the contaminant load of cross-contaminated cheeses decreases linearly as a function of  $i$ , the cheese with rank  $i = 2$  has the highest contaminant load among cross-contaminated cheeses, i.e.  $\max_{i \geq 2}(c(i)_1) = c(2)_1$ . According to eq. (A.2) of appendix A (paragraph III),  $\frac{c(2)_1}{c(1)_0} = p_{cm} \times p_{mc}$ . For  $i = 1$ , the proportion of the final contaminant load of the initially contaminated cheese compared to the initial is  $\frac{c(1)_1}{c(1)_0} = 1 - p_{cm}$ , according to eq (A.1) of appendix A (paragraph III). Finally,

$$J = \max(p_{cm} \times p_{mc}, 1 - p_{cm}) \quad (6)$$

Once more for this scenario, we calculated an indicator  $K$  corresponding to the number of cheeses brushed before the number of CFU on a cheese was reduced to 50% of the contaminant load of the first cross-contaminated cheese, i.e., the one with rank  $i = 2$ . This indicator was defined and used by Christensen and Rosenquist under the name  $B_{half}$  (Christensen et al., 2001; Rosenquist et al., 2003):  $B_{half}$ , for which the actual value was unknown, was thought to influence consequences of cross-contamination of *Campylobacter* between chicken carcasses during slaughtering. They therefore tested different values to observe the impact of this factor on the risk of human campylobacteriosis. We calculated an analytical expression of  $K$  from the system (S) (see appendix C in paragraph III for details):

$$K = 2 - \frac{\log(2)}{\log(1 - p_{mc} - p_{me})} \quad (7)$$

For scenario S2, where cheeses of the batch are all contaminated with the same contaminant load  $C$ , we calculated the reduction rate  $L$  of the contaminant load of cheeses, i.e., for cheese with rank  $i$ ,  $L = 1 - \frac{c(i)_1}{c(i)_0}$ .

The expression obtained is (see appendix D in paragraph III for details):

$$L = p_{cm} - p_{mc} \times \frac{1 - B_L^{i-1}}{1 - B_L} \quad (8), \text{ with } B_L = 1 - p_{mc} - p_{me} \text{ and } i \geq 1.$$

## RESULTS

### Experimental data

Due to microbiological technical problems, one of the series was excluded from the calculations. For the four remaining series, Table 16 shows the logarithm of BL2 counts on cheeses brushed. Index  $i$  is the rank of the cheese brushed. Cheeses with rank  $i = 1$  were produced with BL2 strain (CBL2s). Otherwise ( $i \geq 2$ ), cheeses were produced with BL1 strain (CBL1s).

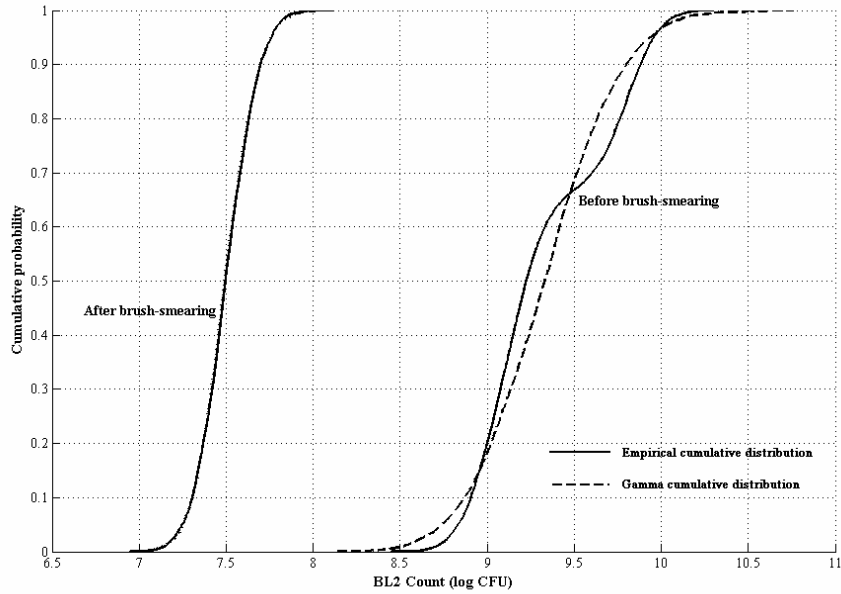
**Table 16 BL2 population on cheese surfaces after brush-smearing. These experimental data represent the logarithm of  $c(i)_1$  (log CFU), for  $i \geq 1$ . Series (1-4) are the repetitions of the experiments.**

i	BL2 population (log CFU)			
	Series 1	Series 2	Series 3	Series 4
1	7.53	-	-	-
2	8.2	8.51	7.85	8.19
3	7.72	8.48	7.81	8.12
4	7.78	8.01	8.02	-
5	7.82	7.84	7.9	-
6	-	-	-	8.15
7	-	-	-	8.02

Measurement of the BL2 population on three CBL2 surfaces before brush-smearing gave 8.99 log CFU, 9.22 log CFU and 9.79 log CFU. BL2 population on the brushes and conveyor belt after the five series was 9.45 log CFU while BL2 population at the bottom of the machine under the conveyor belt was 10.54 log CFU after the five series followed by 30 CBL2s.

### Parameters estimation

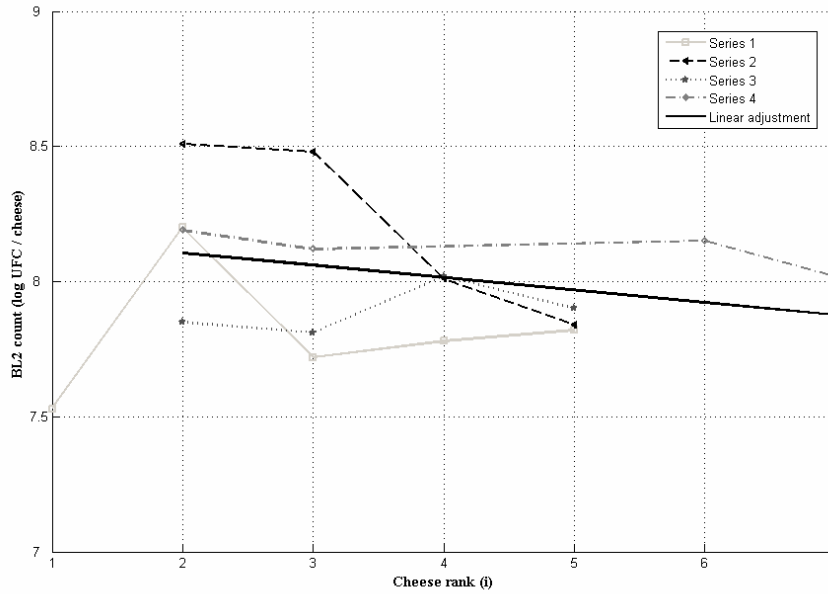
Figure 26 shows cumulative gamma distributions (dotted line) adjusted on the cumulative empirical distributions of the logarithm of the BL2 population of CBL2s, corrected with RNAF (solid line), both before and after brush-smearing. Parameters of the gamma distributions of BL2 counts before and after brush-smearing were respectively  $\{643.2, 0.014\}$  and  $\{2472.5, 0.003\}$ . Mean values of these distributions before and after brush-smearing were respectively 9.33 log CFU ( $IC_{95\%} = [8.62, 10.04]$ ) and 7.52 log CFU ( $IC_{95\%} = [7.23, 7.84]$ ).



**Figure 26 Comparison of cumulative Gamma distribution (dotted line) and cumulative empirical distribution (plain line) for BL2 counts before and after smearing. The Gamma distribution was adjusted on the empirical distribution defined by BL2 counts corrected with RNAF before and after brush-smearing.**

Each simulation generated four series of revised data,  $c_{rev}(i)$ ,  $i \geq 2$ . Fitting the linear model individually on each series provided positive slopes, whereas the analytical solution for transfer parameters required a negative slope. For instance, the linear model adjusted on the third experimental series provided a positive slope which was considered to be due to the Binomial process and the measurement error. Consequently, the linear model was fitted simultaneously on the four series. In this case, about 4% of the 10000 simulations provided positive slopes. Results from these simulations were deleted. The adjustments of the remaining simulations were not of high quality but enabled us to approach a middling value for the slope. As an example, Figure 27 shows the adjustment of the linear model on experimental data. Coefficients of the resulting linear regression were then used to assess transfer parameters. Nevertheless, about 30% of them provided negative  $p_{me}$ . Sets of transfer parameters resulting from these simulations were also deleted from the final empirical distributions of transfer parameters.





**Figure 27 Linear adjustment (least square fitting) on experimental data. The intercept on the vertical axis and the gradient are 8.2 and -0.05, respectively, parameters A and B of eq. (4). The linear adjustment is made here simultaneously for the four experimental series.**

The empirical distributions obtained for transfer parameters (Table 17) show that a high proportion of biomass is transferred from the cheese surface to the machine (mean ( $p_{cm}$ ) = 0.97), whereas only a small proportion is delivered back to the cheese (mean ( $p_{mc}$ ) = 0.05). As described in system (S), a non negligible proportion of biomass is removed principally into the neighbouring environment (mean ( $p_{me}$ ) = 0.07).

**Table 17 Empirical percentiles of transfer parameter distributions.**

Transfer parameter	Percentiles (10000 simulations)				
	2.5%	25%	50%	75%	97.5%
$p_{cm}$	0.96	0.98	0.98	0.99	0.99
$p_{me}$	0.00	0.03	0.06	0.10	0.16
$p_{mc}$	0.01	0.02	0.04	0.06	0.12

Correlations between parameters were not negligible. First, the correlation coefficient between the distributions of  $p_{cm}$  and  $c_{rev(1)0}$  was equal to -0.73. As calculations of  $p_{me}$  and  $p_{mc}$  required values on  $p_{cm}$  and  $c_{rev(i)0}$ , we decided to take the correlation between  $p_{cm}$  and  $c_{rev(i)0}$  into account by sampling the values in their joint distribution. Positive correlations between empirical distributions of transfer parameters were then induced and are listed in

Table 18. In the same manner, sets of transfer parameters were sampled from their joint empirical distributions when simulating cross-contamination.

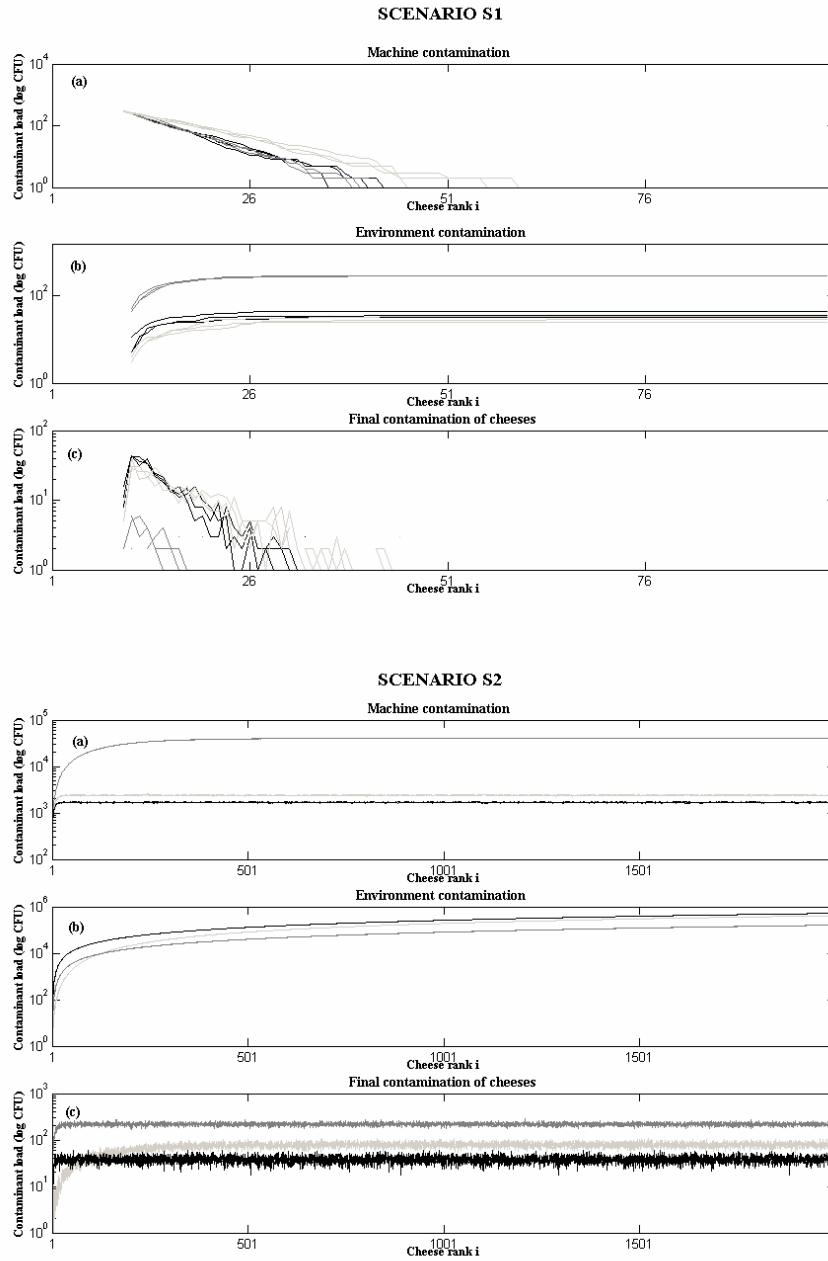
**Table 18 Correlation coefficient between transfer parameter distributions.**

	<b>P<sub>cm</sub></b>	<b>P<sub>me</sub></b>	<b>P<sub>mc</sub></b>
<b>P<sub>cm</sub></b>	1	0.33	-0.82
<b>P<sub>me</sub></b>	0.33	1	-0.36
<b>P<sub>mc</sub></b>	-0.82	-0.36	1

Regarding variance of transfer parameter distributions, lower measurement error ( $< \pm 0.3$  log CFU) had little influence on the results (results not shown), suggesting that variance was induced by the intrinsic variability of the experimental data, notably BL2 population of CBL2s.

### **Simulating cross-contamination for specific scenarios**

For scenarios S1 and S2, three sets of parameters were sampled from their joint empirical distributions and, for each random set of parameters, three simulations were performed using the Binomial process. Figure 28 provides the evolution of the contaminant loads of the machine (a), the environment (b) and the cheeses (c) simultaneously. Contaminant loads are represented on a logarithmic scale in log CFU (ordinates axis) in function of the rank of the cheese (abscissa axis). The colors of the curves are different from one set of transfer parameters to another.



**Figure 28** Example of simulation results for scenarios S1 and S2. Three sets of transfer parameters were sampled and, for each of them, three simulations were performed using the Binomial process. Each colour corresponds to a set of transfer parameters. The contaminant load of a cheese is represented on a logarithmic scale, in log CFU (ordinates axis) in function of its rank (abscissa axis). We observe the evolution of the contaminant load of the machine (a), the environment (b) and the cheeses (c) simultaneously. Characteristics of scenarios S1 and S2 are  $\{N=1, NR=2000, C=300, R=10\}$  and  $\{N=NR=2000, C=300, R=[1,N]\}$ , respectively.

Results for S1 show the linear decrease of the logarithm of the contaminant load on cross-contaminated cheeses (cheeses not initially contaminated) in function of their rank. Fluctuations during the decrease were due to the Binomial process. As in the experimental data (Table 16), the contaminant load of a cheese can be

higher than that of the previous cheese because of both the Binomial process and measurement error. The prevalence of contaminated cheeses increases highly and their contaminant load is much lower than 300 CFU.

Monte Carlo simulations using random sets of transfer parameters showed that the mean and standard deviation of the maximum proportion of contaminant load observed on cross-contaminated cheeses compared to the initial contaminant load were respectively 4.7% and 3.0%. Less than 2% of the initial contaminant load of the initially contaminated cheese remains on its surface (mean value). Thus, the mean and standard deviation of  $J$ , taking account of the joint distributions of parameters, were 4.7% and 3.0%. In the same manner, the mean of the indicator  $K$ , calculated using eq. (7), was 9 cheeses ( $IC_{95\%} = [5, 19]$ ).

Results for S2 indicate that contaminant load of cheeses decreases after brush-smearing. After a transitional period, contaminant loads of both the machine and the cheeses level off. As expected, the contaminants loads of cheeses are lower when cheeses belong to the transitory phase. Monte Carlo simulations, taking into account transfer parameter uncertainty in eq. (8), showed that the stable phase was reached after about the 100<sup>th</sup> cheese (mean value) and that mean and standard deviation of the reduction rate  $L$  were 55% and 25%.

The variance of the results comes from both the joint distribution of transfer parameters and the Binomial process. This paragraph describes the influence of transfer parameter uncertainty and the Binomial process on variance results for S1. Regarding transfer parameter uncertainty, applying eq. (5) to random sets of transfer parameters in Monte Carlo simulations showed that mean and standard deviation of the number of cross-contaminated cheeses  $I$  increased linearly in function of the logarithm of  $C$  (Table 19). The contaminant load  $C$  varied between 1 and 6 log CFU since we considered that a contaminant load above 6 log CFU was not realistic for the scenario of a product's surface recontamination. The Binomial process also influences variance of the results: given a set of transfer parameters, stochastic simulations with the Binomial process showed that the standard deviation of  $I$  remained constant when  $C$  increased, and, no matter what the set of parameters, this standard deviation did not exceed 2 cheeses. Thus, for stochastic simulations with both random sets of transfer parameters and the Binomial process, variance of the results was mainly due to parameter uncertainty.

**Table 19 Evolution of the number of cross-contaminated cheeses  $I$  for scenario S1, function of the initial contaminant load  $C$ . 10000 simulations using empirical distributions of transfer parameters were performed.**

$C$ (log CFU)	Mean ( $I$ )	Std ( $I$ )
1	2	1
2	14	6
3	36	18
4	59	30
5	81	44
6	104	59

To conduct the experiments and define the experimental design, we previously used a model slightly different from the one presented in this paper. With this previous model, we performed simulations of the scenario of one cheese contaminated with 10 log CFU. Values of transfer parameters were sampled in a uniform distribution with parameters 0 and 1. Results of the simulations showed that a maximum of 30 cheeses were necessary to clear the brush-smearing machine of the contaminant population (results not shown). This result was used in the experimental design of the experiments: between two CBL2s, 30 CBL1s passed through the machine. However, using the current model, simulation results of cross-contamination showed that more than 30 cheeses could be necessary for the machine to be cleared of the contaminant population (Table 19). We next simulated the scenario of one CBL2 followed by 30 CBL1s to calculate the BL2 population remaining in the machine after the 30<sup>th</sup> CBL1. Transfer parameter distributions were assessed using the previously presented procedure (Figure 25) but with the first experimental series only in order to eliminate bias. The initial BL2 population of CBL2 followed the gamma distribution assessed using BL2 counts of CBL2s, before brush-smearing (Figure 26). 90% of 500 simulations provided a BL2 population on the machine lower than 8 log CFU after the 30<sup>th</sup> CBL1 had been treated in the machine. Next, when using transfer parameters assessed from the four experimental series, 70% of 500 simulations gave a residual BL2 population in the machine of less than 8.2 log CFU. This residual BL2 population in the machine represented 5% of the load taken by the brush from a CBL2 (mean value). Therefore, as the aim of these experiments was to obtain an order of magnitude on transfer parameter values, we considered the influence of this bias on the independence between experimental series negligible.

The simulations of the scenario of the experiments provided differences between experimental results (BL2 population in the machine after the five series and BL2 population in the environment after the five series followed by 30 CBL1s) and simulated results. After brush-smearing of the five series, the simulated mean of the machine's BL2 population was 10.55 log CFU, whereas the experimental result was 9.45 log CFU. After the whole scenario, the simulated mean of the neighboring environment's BL2 population was 10.71 log CFU, whereas the experimental result was 10.54 log CFU. These differences are due, among other things, to the fact that only a part of the machine and environmental compartments could be analyzed: regarding the neighboring environment, the inside surface at the bottom of the machine under the conveyor belt was analyzed but not the exterior of the machine (notably the floor). Regarding the machine, direct contact surfaces were analyzed (brushes and conveyor belt) but not indirect contact surfaces (notably the inner walls of the machine). Another reason for these differences is the uncertainty of the measurement method of the BL2 population.

## DISCUSSION

Several aspects of the model should be highlighted. Concerning model validation, confidence in simulated results depends on the propensity of the theoretical model to match reality. Even if the differences between simulated and experimental results are partially related to the fact that neither the whole machine nor the complete environment could be analyzed, the fact remains that more experimental data is necessary to properly validate this cross-contamination model.

It has to be recognized that the analytical solution for transfer parameters (eq. (1), (2), (3) and (4)) is based on the experimental protocol: the first cheese only is contaminated (with a known contaminant load) which makes it possible to assess first  $p_{cm}$ , and then the pair  $(p_{mc}, p_{me})$  using results on  $p_{cm}$ . As seen from the present experiments, uncertainty engendered by transfer parameters is relevant. Such a situation is due mainly to the uncertainty of the measurement method and the intrinsic variability of the experimental data. However, these experiments facilitate the development of a plausible idea for transfer parameter values. If transfer parameter uncertainty can be reduced, variance due to the Binomial process can then be taken into account, paving the way for more realistic results in quantitative risk assessment (Nauta, 2000).

The approach used here is different from the traditional approach which focuses on individual transfer rates between various surface and/or various products for a defined microorganism (Chen et al., 2001; Kusumaningrum et al., 2003; Kusumaningrum et al., 2004). Our approach presents an advantage because we are interested in the case of limited contamination of undesirable microorganisms spread through the biomass of the product surface (induced by a recontamination event, for instance). This hypothesis leads us to assume that the undesirable microorganisms do not modify the behavior of the biomass. Thus, to assess transfer parameters, only one microorganism constituting the biomass of the product surface is necessary (here, *Brevibacterium linens*) and these transfer parameters can then be applied to any undesirable microorganism.

According to the literature, the linear decrease of the logarithm of the contaminant load on cross-contaminated products (for scenario S1) seems plausible and has already been observed. When assessing microbial populations on hands, Veulemans et al. observed that the logarithm of the contaminant load of the adhesive tape in contact with hands decreased linearly in function of the tape rank (Veulemans et al., 1970). Midelet et al. also applied this model to assess the attachment strength of microorganisms on some surfaces, including *L. monocytogenes* (Midelet and Carpentier, 2002). Vorst et al. have recently shown data that reinforced the idea of a linear decrease for scenario S1 (Vorst et al., 2004) : the experiments performed quantify the transfer rate of *L. monocytogenes* from inoculated products to uninoculated products via a slicing machine. In similar experiments, Pérez et al. observe the transfer rate of *Staphylococcus aureus* from the machine to uninoculated products (Pérez et al., 2004b). For both studies, a linear decrease of the logarithm of the contaminant load of cross-contaminated product in function of the slice rank is observed. Transfer rates obtained for *L. monocytogenes* are different from one inoculum to another. However, pure inoculums of *L. monocytogenes* were used, whereas the central concept of our model is that contaminant cells are diluted in

the biomass of the cheese surface, so that transfer parameters do not depend on the initial contaminant load of the contaminated product. Moreover, adhesion of cells to the surface may influence results on transfer rates, which is not the case here (Beresford et al., 2001).

Christensen et al., when developing risk assessment on *Campylobacter* spp. in chicken products (Christensen et al., 2001; Rosenquist et al., 2003), modelled cross-contamination between carcasses by means of linear decrease of the logarithm contaminant load on carcasses for scenario S1. However, they did not give any analysis showing that the linear regression was the proper solution. The slope of this decrease was determined by the indicator  $B_{half}$ , defined by the number of carcasses that needs to be slaughtered before the number of *Campylobacter* cells on a bird was reduced to 50% of the contaminant load of the first cross-contaminated carcass. As  $B_{half}$  was currently unknown, five different values were used, from 300 to 6000. The indicator  $K$  we used, which had the same definition as  $B_{half}$ , was analytically calculated (eq. (7)) from the system (S). Its mathematical expression did not depend on the initial contaminant load of the initially contaminated cheese but rather on only the slope of the linear regression, i.e., on  $p_{mc}$  and  $p_{mc}$ . We believe that this indicator, a cross-contamination *strength*, represents an efficient summary of the cross-contamination propensity of the process and can be deduced mathematically from transfer parameters of the system (S).

Concerning the impact of brush-smearing on cheese contamination, results for scenario S2 show that the initial contaminant load of a homogeneous contaminated batch will be reduced by more than a half. That result proves the efficiency of brush-smearing since one aim of this processing step is to extract potential undesirable microorganisms that could arise from the environment. For scenario S1, where one cheese was contaminated, less than 2000 cheeses were contaminated, no matter what the initial contaminant load (Table 19). Thus, in the case of the plant where experiments were conducted and where hygienic measures of the machine are planned about every 2000 cheeses, the model indicates that this frequency of cleaning and disinfection is not sufficient to stop a cross-contamination event inside a batch. Results for scenario S1 also indicate that the contaminant load of the initially contaminated cheese is highly spread on the cross-contaminated cheeses with small contaminant loads: the contaminant load of the first cheese cross-contaminated represents less than 5% of the initial contaminant load. Thus, microbial analysis of products during the process should be performed once the detection level of the test used to search out an undesirable microorganism is known: for a test able to detect any level of population, products should be analyzed after brush-smearing because of the high number of contaminated cheeses. At the same time, the model suggests that there may be a threshold combining number of contaminated cheeses and initial contaminant load above which products will be detectable before brush-smearing but not after. This threshold depends on the detection level of the test for the microorganism concerned. This model could thus be used as an objective tool to improve sampling in a plant.

This model will be integrated in the future as a module in the microbial quantitative assessment of listeriosis linked to the consumption of soft cheeses made from pasteurized milk taking the whole process into account.

Inputs of this model are the rank of the contaminated cheeses of a batch and their level of contamination, which come from the previous step of the process. Integration of this step will considerably improve results in listeriosis risk detection since physical and chemical parameters of cheeses during ripening, such as temperature and pH, affect the growth of *L. monocytogenes* (Ryser and Marth, 1987; Sanaa et al., 2004) even if contaminant loads of cross-contaminated cheeses are low. However, the question of the breaking up of a colony forming unit during brush-smearing and after a growth period remains to be addressed, as we do not yet know the mechanical effect of brushing on it. Assumptions lead to two extremes: (1) a CFU is totally broken up, forming as much new CFU as the number of microorganisms it contained before brushing; (2) a CFU is not broken up and the whole CFU is transferred. No literature is available on the splitting of colonies. Experiments should therefore be performed to gain understanding of this phenomenon and add a splitting factor to the model. Such a factor would be applied to any CFU coming from the surface of the cheese and entering the machine. As the final number of contaminated cheeses depends on the initial contaminant load of initially contaminated cheeses, splitting CFUs entering the machine would have consequences on the results.

More generally, this model may represent a generic model for cross-contamination. First, the concept of mechanistically modeling the biomass transfer coming from the product makes it possible to apply the cross-contamination model to any undesirable microorganism. Secondly, it is based on logical and simple ideas, compartments and transfer rates between them, which are easily recognizable for many processes prone to cross-contamination (like handling or slicing). Using an adapted marker, the same experiments can be organized. The cross-contamination *strength*, defined above and for which analytical expression is available with eq. (7), could be used to compare industrial culture processes prone to cross-contamination and fitting our model.

Finally, the model also highlights the correlation between contamination of the product by the environment and cross-contamination (Tompkin, 2002). Indeed, the model shows how the environment and the machine become contaminated during the process. Sampling results from industrial plants often present a persistence of strains in the environment and/or on machines (Lappi et al., 2004; Wiedmann et al., 2004). This persistence can be explained by the difficulty of completely eradicating undesirable microorganisms from the machine and the environment (Lunden et al., 2003a). Improvements to this model could thus help to gain a better understanding of the dynamic of a plant contamination.



## II. Cas des soins manuels

Une pratique plus traditionnelle consiste à soigner les fromages manuellement. Des opérateurs, disposant de solution, l'étalent manuellement à la surface du fromage. A l'instar des soins mécaniques, ce procédé présente des risques d'amplification d'une contamination à partir de fromages initialement contaminés en surface.

La présente étude a été conduite en partenariat avec une fromagerie fabriquant un fromage à pâte molle à croûte lavée. Cette fromagerie présentait, entre autres, l'avantage d'utiliser deux systèmes de soins manuels, le nouveau système de soins manuels, dits « sécurisés » étant a priori plus sécurisé que l'ancien système de soins manuels, dits « classiques » : en effet, avec le nouveau système, la solution apportée à la surface des produits est toujours neuve. Deux objectifs étaient visés : d'une part, élargir l'approche de modélisation de la contamination croisée à divers procédés ; d'autre part, comparer les différents procédés étudiés en quantifiant le gain de sécurité d'un procédé à l'autre.

La trame de l'étude, comportant deux principales étapes, est similaire à celle des soins mécaniques. Chaque étape de cette trame a été conduite parallèlement pour les deux types de procédé étudiés. La première étape vise à modéliser les systèmes de soins et estimer les paramètres des modèles résultants :

- modélisation compartimentale et dynamique du transfert de matière au cours des soins
- acquisition de données expérimentales en conditions réelles
- prise en compte de l'incertitude des données par simulation
- estimation des paramètres de transfert par ajustement des données simulées sur les équations des modèles
- obtention de la distribution empirique des paramètres

La deuxième étape consiste à simuler la contamination croisée au cours des soins manuels :

- choix d'un scénario de contamination initiale d'un lot
- observation de la répartition des charges bactériennes sur les produits du lot après les soins

Suite à la présentation des résultats associés aux différentes étapes de l'étude est ajoutée une analyse comparative des trois types de soins possibles : soins manuels classiques, soins manuels sécurisés et soins mécaniques.

### A. Matériels et méthodes

#### 1) Concept fondamental de l'étude

L'opération de soins en cours d'affinage consiste à déposer de la solution de soins sur la surface des fromages. Les fromages sont traités consécutivement. Entre deux séries de produits a lieu une rupture hygiénique (lavage des mains et de l'environnement) selon une fréquence propre à l'usine. A l'intérieur d'une même série, un

transfert de biomasse (constituée de matière organique et de microorganismes, notamment les souches technologiques ajoutées au cours du procédé de fabrication) entre plusieurs produits peut s'opérer, par l'intermédiaire des mains et de la solution de soins, et être à l'origine du phénomène de contamination croisée. Pour cette raison, les modèles construits pour les soins manuels classiques et les soins manuels sécurisés décrivent le transfert de solution et de biomasse entre les compartiments des deux procédés.

Les expériences conduites avaient pour objectif de mesurer les quantités de solution et de biomasse transférées entre compartiments, en grammes. Ces quantités n'étant pas observables directement, la modélisation a permis d'obtenir une estimation de ces valeurs. Ainsi, connaissant le nombre initial de microorganismes pathogènes présents dans un des compartiments, il devient alors possible de simuler le flux des microorganismes entre les compartiments du système et, à terme, d'évaluer les risques potentiels de contamination croisée du procédé.

## **2) Collecte des données expérimentales**

Le fromage à pâte molle au lait pasteurisé utilisé pour l'étude fait l'objet de soins manuels tous les 2 à 3 jours sur une période de 4 à 5 semaines. Entre deux soins les produits sont entreposés dans un hâloir dans lequel les flores technologiques ajoutées au cours des soins se développent. L'expérience a été réalisée en conditions réelles, sur des fromages subissant leur quatrième soin.

#### *Description des soins manuels classiques*

Quatre opérateurs sont répartis autour d'une même table de soins. Un récipient de solution de soins par opérateur est posé sur la table de soins. Les opérateurs travaillent simultanément. Lors du traitement d'un fromage, chaque opérateur récupère de la solution de soins dans sa main et la dépose à la surface du fromage. Sous la table, légèrement inclinée et percée de deux trous, sont placés deux conteneurs permettant la récupération de la solution perdue dans l'environnement (Figure 29).

L'expérience a été conduite sur 300 fromages, soignés par quatre opérateurs portant des gants et travaillant simultanément, soit environ 75 fromages par opérateur. Les mesures suivantes ont été effectuées à trois reprises au cours du traitement des fromages, à intervalles réguliers et pour chacun des opérateurs :

- la masse du contenu du récipient
- la masse du dépôt présent sur les gants
- le pourcentage d'extrait sec de la solution contenue dans le récipient

Le contenu des conteneurs a été pesé après le soin des 300 fromages. Enfin, une même pile de 500 fromages a été pesée avant et après soins.

#### *Description des soins manuels sécurisés*

Le procédé est similaire à celui des soins manuels classiques excepté le fait que la main récupère de la solution neuve à partir d'un robinet, relié à un récipient la contenant. Cette solution est libérée par le robinet à l'approche de la main, grâce à des capteurs capables de la détecter. Un bac de récupération, placé sous le robinet utilisé par chaque opérateur, permet de récupérer la solution perdue lorsque la main recueille la solution (Figure 30).

L'expérience a été conduite pour 199 fromages, soignés par quatre opérateurs travaillant simultanément. Après le soin d'une série d'environ 50 fromages par opérateur, ont été mesurées pour chaque opérateur,

- la masse du contenu du bac de récupération
- la masse du dépôt présent sur les gants
- le pourcentage d'extrait sec du contenu du bac de récupération.

Enfin, deux pesées d'une même pile de fromages ont eu lieu avant et après soins.

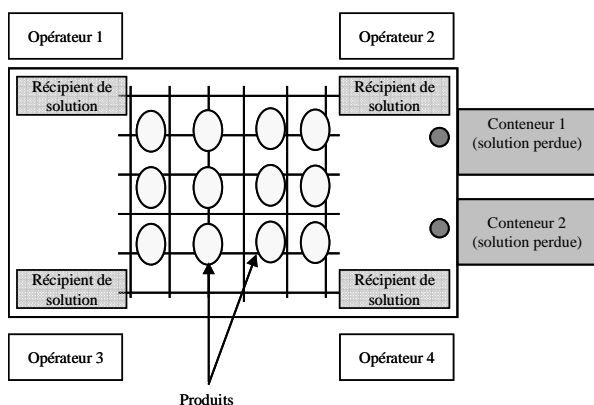


Figure 29. Soins manuels classiques

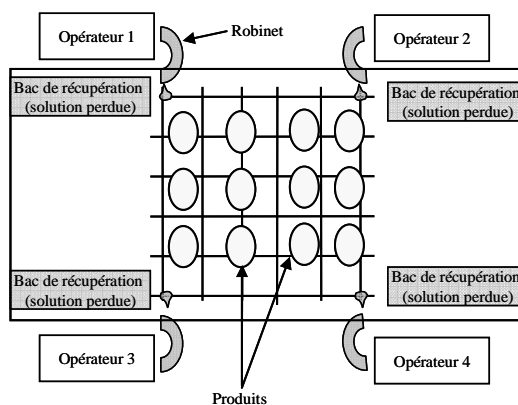


Figure 30. Soins manuels sécurisés

La quantité d'extrait sec des échantillons de solution analysés étant trop faible, leur densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. Le colorant ajouté est le noir amido, fixant les protéines. Afin de déduire des valeurs de densité optique le pourcentage d'extrait sec de fromage, une courbe d'étalonnage entre ces deux mesures a été construite par dilutions successives d'un échantillon de fromage de 10 grammes, dont le pourcentage d'extrait sec initial s'élève à 43,55%. Un modèle linéaire a été ajusté sur ces données (Figure 31), dont la qualité d'ajustement se traduit par un  $R^2$  égal à 0,99. L'équation de régression permet d'estimer le pourcentage d'extrait sec présent dans la solution.

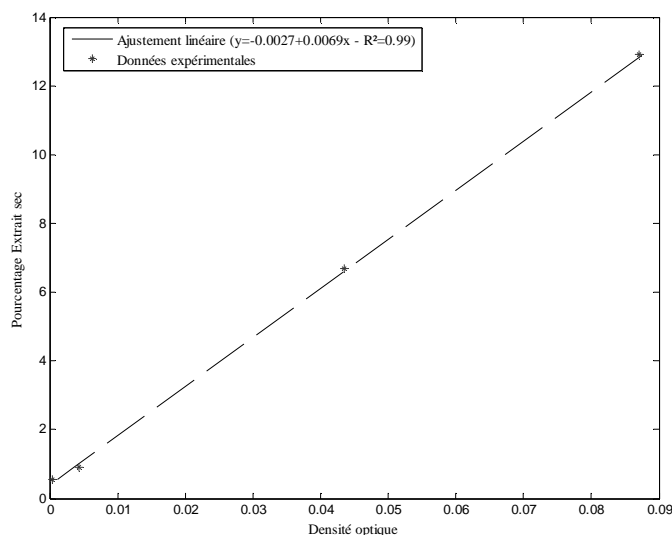


Figure 31. Courbe d'étalonnage entre le pourcentage d'extrait sec et la densité optique

### 3) Modélisation du transfert de matière entre compartiments

Soit un système constitué de quatre compartiments : les *main*s, le récipient contenant la *solution*, la surface du *fromage* et l'*environnement*. Entre ces quatre compartiments se produit un échange de *biomasse*, provenant de la

surface des fromages soignés, et de *solution*, provenant du récipient. Le mélange de biomasse et de solution forme ce qui est appelé *matière* dans la suite du texte.

Ce système est lui-même divisé en deux sous systèmes : le premier sous-système modélise le transfert de matière entre l'environnement, la solution et les mains et le deuxième modélise le transfert de matière entre les mains et la surface du produit. Chronologiquement, le premier sous-système (récupération de solution) précède le deuxième (soin du produit). Le premier sous-système est spécifique à chaque procédé alors que le deuxième sous-système est commun aux deux procédés.

Les systèmes d'équations (S1) et (S2) modélisent le transfert de matière d'un compartiment à l'autre pour les soins manuels classiques et soins manuels sécurisés respectivement. Après le soin du fromage de rang  $i$  sont calculées les quantités de matière dans chaque compartiment. Ces quantités peuvent s'exprimer en grammes ou en millilitres, la masse volumique de la solution étant supposée être égale à celle de l'eau (1 millilitre = 1 gramme). Dans la suite, nous avons choisi d'exprimer les quantités de matière en grammes.

Les notations des deux modèles de transfert de matière sont les suivantes : le compartiment  $C_k$  contient une quantité de matière  $k(i)$  après le soin du fromage de rang  $i$ .  $q_{ij}$  est la quantité de matière transférée entre les compartiments  $C_i$  et  $C_j$  (Figure 32).  $k(i)$  varie en fonction des quantités de matière transférées entre deux compartiments.

$s(i)$  représente la masse de matière présente dans le compartiment *solution*.  $m(i)$  représente la masse du dépôt de matière présente sur les *mains* après le soin du fromage de rang  $i$ .  $e(i)$  représente la masse de matière présente dans *l'environnement*, et plus particulièrement dans les conteneurs ou bacs de récupération. Enfin,  $f_0(i)$  et  $f_1(i)$  représentent les quantités de matière présentes à la surface du fromage de rang  $i$  avant et après soins, respectivement. Basés sur les résultats de l'étude de la contamination croisée lors des soins mécaniques, il est supposé que la quantité de matière à la surface du fromage sollicitée au cours du soin est  $f_0(i) = qf = 0,5$  gramme pour tout  $i > 1$ .

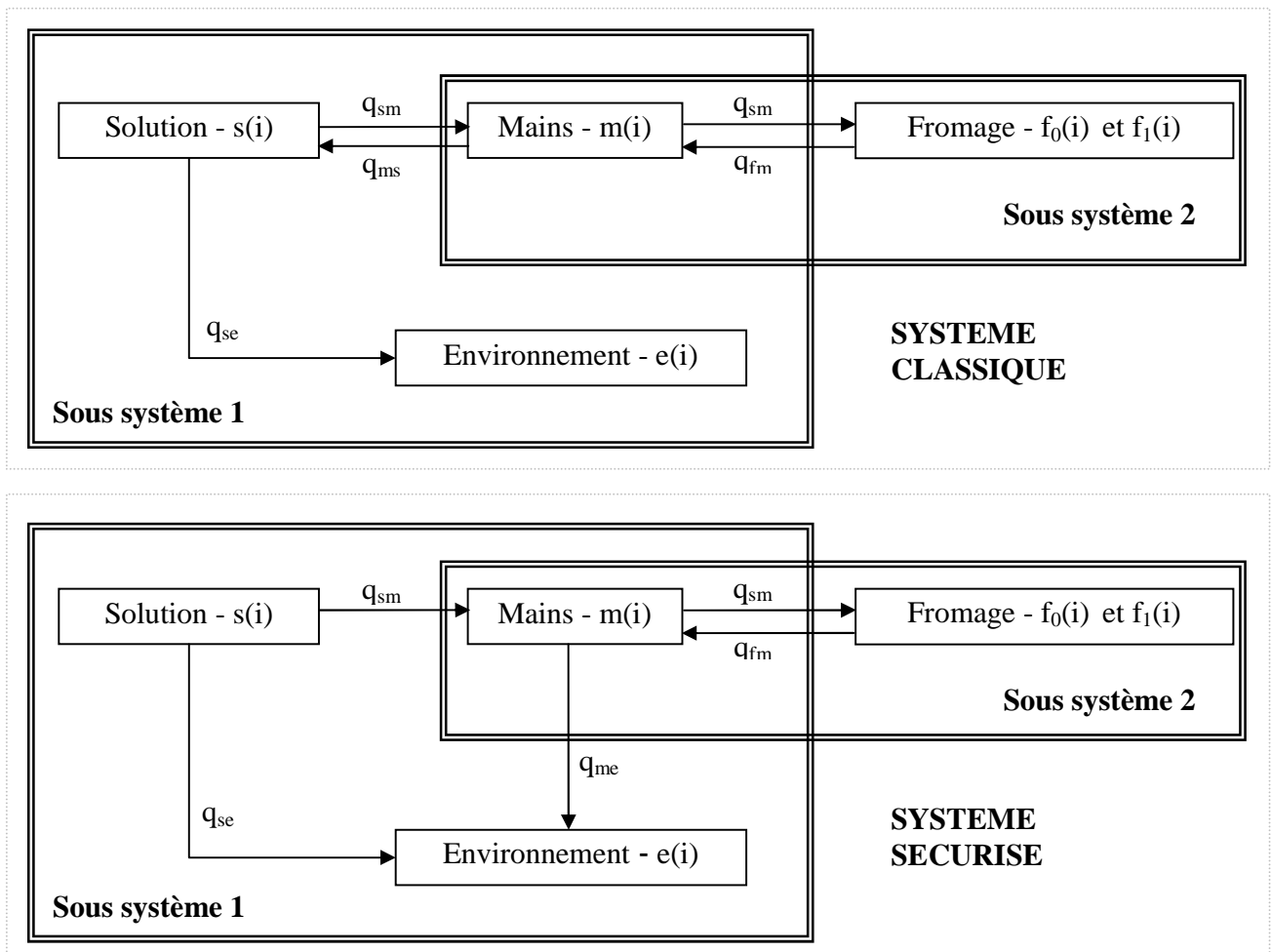


Figure 32 Modèle de transfert de matière au cours des soins manuels. Un échange de matière s'opère entre la solution, les mains, le produit et l'environnement.  $s(i)$ ,  $m(i)$  et  $e(i)$  sont les quantités de matière présentes dans ces compartiments après le soin du fromage de rang  $i$ . Les quantités transférées entre compartiments s'expriment en grammes et sont constantes au cours du temps.  $f_0(i)$  et  $f_1(i)$  sont les quantités de matière présente à la surface du fromage avant et après soin respectivement.

*Produit de rang  $i=1$*

Initialement ( $i=0$ ), une quantité  $q_s > 0$  de solution peut être distribuée. L'environnement et les mains sont exempts de toute matière ( $e(0) = m(0) = 0$ ). La quantité de biomasse à la surface du fromage de rang 1 et sollicitée au cours du soin est  $f_0(1) = q_f = 0,5$ .

Dans le cadre du système classique, la main de l'opérateur récupère la solution directement depuis le récipient, avant le soin du premier fromage. Une quantité  $q_{se}$  est perdue dans l'environnement, principalement sur la table de soins, et récupérée dans les conteneurs.

Dans le cadre du système sécurisé, la main récupère de la solution neuve à partir d'un robinet relié au récipient contenant la solution ; une quantité de solution neuve  $q_{se}$  est alors perdue dans l'environnement et récupérée dans le bac de récupération placée sous les mains de l'opérateur.

La quantité restante,  $q_{sm}$ , est déposée sur la surface du fromage et étalée par frottements entre les mains et la surface du fromage, ce qui constitue l'opération proprement dite de soin du fromage. Au cours de ce frottement, solution et biomasse s'homogénéisent. Une quantité  $q_{fm}$  de ce mélange est récupérée par la main sous forme de dépôt.

Les systèmes d'équations (S1) et (S2) sont confondus et vérifient alors pour  $i = 1$  :

$$\begin{cases} s(0) = q_s, e(0) = m(0) = 0, f_0(i) = q_f \quad \forall i \geq 1 \\ s(1) = q_s - q_{se} - q_{sm} \\ m(1) = m(0) + q_{fm} = q_{fm} \\ e(1) = e(0) + q_{se} = q_{se} \\ f_1(1) = f_0(1) + q_{sm} - q_{fm} = q_f + q_{sm} - q_{fm} \end{cases}$$

#### *Produits de rang $i > 1$ - Sous système 1*

Dans le cadre du système classique, lorsque la main prend de nouveau de la solution dans le récipient pour le soin du fromage de rang  $i$ , une quantité  $q_{ms}$  du dépôt présent sur la main est transférée dans le récipient. Ce dépôt est supposé se dissoudre dans la solution. De la même manière que précédemment, une quantité  $q_{se}$  de solution, contenant à présent de la matière sèche, est transférée à l'environnement et une quantité  $q_{ms}$  est transférée à la surface du fromage de rang  $i$  lors du soin (cf. sous système 2).

Dans le cadre du système sécurisé, lorsque la main récupère de la solution depuis le robinet pour le soin du fromage de rang  $i$ , une quantité  $q_{se}$  de solution neuve est de nouveau transférée à l'environnement et récupérée dans le bac de récupération, ainsi qu'une quantité  $q_{me}$  de dépôt présent sur la main, qui est supposé se dissoudre dans le contenu du bac. Parallèlement, une quantité  $q_{ms}$  de solution neuve est transférée à la surface du fromage de rang  $i$  lors du soin.

### Produit de rang $i > 1$ - Sous système 2

Concernant le produit, au cours du soin, le dépôt présent sur la main, la solution (contenant de la matière sèche), et la matière en surface du fromage se mélangent de manière homogène ; la main récupère une quantité  $q_{fm}$  de ce mélange, l'autre reste sur la surface du fromage (Figure 32). Enfin, il est supposé qu'après un transfert, la matière introduite dans un compartiment se mélangent parfaitement à la matière du compartiment d'accueil et se.

$$\begin{aligned}
 (S1) \quad & \begin{cases} s(i) = s(i-1) - q_{se} - q_{sm} + q_{ms} & (1) \\ m(i) = m(i-1) + q_{fm} - q_{ms} & (2) \\ e(i) = e(i-1) + q_{se} & (3) \\ f_1(i) = f_0(i) + q_{sm} - q_{fm} & (4) \\ s(0) = qs, e(0) = m(0) = 0, f_0(i) = qf \quad \forall i \end{cases} \\
 (S2) \quad & \begin{cases} s(i) = s(i-1) - q_{se} - q_{sm} & (5) \\ m(i) = m(i-1) + q_{fm} - q_{me} & (6) \\ e(i) = e(i-1) + q_{se} + q_{me} & (7) \\ f_1(i) = f_0(i) + q_{sm} - q_{fm} & (8) \\ s(0) = qs, e(0) = m(0) = 0, f_0(i) = qf \quad \forall i \end{cases}
 \end{aligned}$$

## 4) Estimation des paramètres des modèles

La matière transférée entre deux compartiments est un mélange de solution et de biomasse. La biomasse contient elle-même de la matière sèche. Les données expérimentales concernant d'une part la *matière totale* (mélange de solution et de biomasse) et d'autre part, la *matière sèche*, nous avons mis en équation séparément le transfert de chacun de ces composants à partir des systèmes (S1) et (S2).

### Estimation du paramètre $q_{sm}$

L'apport en solution à la surface du fromage est décrit par les équations (4) et (8) des systèmes (S1) et (S2) respectivement. La quantité  $q_{fm}$  étant négligeable par rapport à la quantité  $q_{sm}$ , représentant l'apport en solution à la surface du fromage, ces équations se simplifient toutes deux sous la forme suivante :  $f_1(i) = f_0(i) + q_{sm}$ .

La différence de masse  $d$  mesurée suite à la pesée de 500 fromages avant et après soin vérifie l'équation suivante:  $d = 500 \times q_{sm}$ . D'après des expérimentations réalisées en interne,  $q_{sm}$  est variable d'une série de produits et son écart-type est 0,3 gramme. Ainsi, on suppose que  $q_{sm}$  est la réalisation d'une loi de distribution normale de moyenne  $d/500$  grammes et d'écart type 0,3 grammes.

### Estimation du paramètre $q_{fm}$

Soit  $es\_f_0(i)$ , le pourcentage de matière sèche à la surface du produit de rang  $i$  avant soin. Sa valeur étant supposée fixe d'un produit à l'autre, elle vérifie  $es\_f_0(i) = es\_f_0 \quad \forall i$ .

Soit  $es\_m(i)$  le pourcentage de matière sèche du dépôt présent sur la main après le soin du fromage de rang  $i$ .



Dans le cadre du système classique, soit  $es_s(i)$ , le pourcentage de matière sèche dans la solution du récipient après le soin du fromage de rang  $i$ .

Soit  $ms_s(i)$ , la quantité de matière sèche dans la solution du récipient après le soin du fromage de rang  $i$ .

Dans le cadre du système sécurisé, soit  $es_e(i)$ , le pourcentage de matière sèche dans la solution du bac de récupération après le soin du fromage de rang  $i$ .

Soit  $ms_e(i)$ , la quantité de matière sèche dans la solution du bac de récupération après le soin du fromage de rang  $i$ .

Après soin du fromage de rang  $i$  et en raison de l'homogénéisation entre la solution fournie par la main, la matière présente sur la main et la matière issue de la surface du fromage, le pourcentage de matière sèche du dépôt présent sur la main et à la surface du fromage vérifie :

$$es_m(i) = \frac{es_s(i) \times q_{sm} + f_0(i) \times es_{f_0}(i) + m(i-1) \times es_m(i-1)}{q_{sm} + f_0(i) + m(i-1)}$$

En supposant que la contribution de la solution à l'augmentation du pourcentage de matière sèche du dépôt des mains est négligeable ( $es_s(i) \times q_{sm} = 0$ ), le pourcentage d'extrait sec ne dépend plus du rang  $i$  et vérifie (cf. démonstration dans l'appendice E du paragraphe III de ce chapitre):

$$es_m(i) = es_m = \frac{qf \times es_{f_0}}{q_{sm} + qf}, \forall i \text{ (E1)}.$$

Dans le cadre du système classique, l'évolution de la matière sèche dans la solution du récipient est due à l'apport de matière sèche par la main, lorsque la main récupère la solution. On considère en effet que la quantité de matière sèche contenue dans la solution et récupérée par la main est négligeable. Ainsi, l'évolution de la quantité de matière sèche dans la solution du récipient entre les soins des fromages  $i$  et  $i-1$  peut être modélisée selon l'équation suivante :

$$ms\_s(i) - ms\_s(i-1) = es\_m \times q_{ms} \quad \forall i > 1 \text{ (E2)}$$

De plus, après le soin du fromage de rang  $i = 1$ ,  $ms\_s(i) = 0$ .

Parallèlement, la quantité de matière sur les mains vérifie pour  $i > 1$ :

$$m(i) - m(i-1) = q_{fm} - q_{me} \quad \forall i > 1 \text{ (E3)}.$$

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les données d'évolution des quantités de matière totale sur les mains et dans la solution, et de la quantité de matière sèche dans la solution. Les pentes des droites de régression résultant de l'ajustement fournissent les estimations de  $m(i) - m(i-1)$  et  $ms\_s(i) - ms\_s(i-1)$ , notées  $\hat{m}$  et  $\hat{ms\_s}$ , respectivement, dont les valeurs sont constantes pour tout  $i > 1$ .

Dans le cadre du système sécurisé, l'évolution de la matière sèche dans la solution du bac de récupération est due à l'apport de matière sèche par la main, lorsque la main récupère la solution. Ainsi, l'évolution de la quantité de matière sèche dans la solution du bac de récupération respectivement entre les soins des fromages  $i$  et  $i-1$  peut être modélisée selon l'équation suivante :

$$ms\_e(i) - ms\_e(i-1) = es\_m \times q_{me} \quad \forall i > 1 \text{ (E2')}$$

De plus, après le soin du fromage de rang  $i = 1$ ,  $ms\_e(i) = 0$ .

Parallèlement, la quantité de matière sur les mains vérifie pour  $i > 1$ :

$$m(i) - m(i-1) = q_{fm} - q_{me} \quad \forall i > 1 \text{ (E3')}.$$

Un modèle de régression linéaire a été ajusté sur les données d'évolution des quantités de matière totale sur les mains et dans le bac de récupération, et de la quantité de matière sèche du bac de récupération. Les pentes des droites de régression résultant de l'ajustement fournissent les estimations de  $m(i) - m(i-1)$  et  $ms\_e(i) - ms\_e(i-1)$ , notées  $\hat{m}$  et  $\hat{ms\_e}$  respectivement, dont les valeurs sont constantes pour tout  $i > 1$ .

#### *Estimation du paramètre $q_{se}$*

Dans le cadre du système classique, la variation de la quantité de matière dans le récipient contenant la solution,  $s(i) - s(i - 1)$ , entre les soins de deux produits résulte principalement du transfert de matière depuis le récipient vers la main et vers l'environnement. En effet, la quantité de matière transférée de la main vers la solution est négligeable.

On a donc :

$$s(i) - s(i - 1) = -q_{se} - q_{sm} \quad \forall i > 1 \quad (E4)$$

De la même manière que précédemment, la pente d'un modèle de régression linéaire ajusté sur les données expérimentales représentant l'évolution de la quantité de matière totale dans le récipient fournit l'estimation de  $s(i) - s(i - 1)$ , notée  $\hat{s}$ , dont la valeur est constante pour tout  $i > 1$ .

#### *Estimation du paramètre $q_{me}$*

Dans le cadre du système sécurisé, la variation de la quantité de matière dans le bac de récupération,  $e(i) - e(i - 1)$ , entre les soins de deux produits résulte principalement du transfert de matière depuis le robinet vers l'environnement. En effet, la quantité de matière transférée de la main vers l'environnement est négligeable.

On a donc :

$$e(i) - e(i - 1) = q_{se} \quad \forall i > 1 \quad (E4')$$

De la même manière que précédemment, la pente d'un modèle de régression linéaire ajusté sur les données expérimentales représentant l'évolution de la quantité de matière totale dans le bac de récupération fournit l'estimation de  $e(i) - e(i - 1)$ , notée  $\hat{e}$ , dont la valeur est constante pour tout  $i > 1$ .

L'ajustement des régressions linéaires sur les courbes d'évolution de la matière et de la matière sèche des compartiments concernés a été effectué sur les données des quatre opérateurs simultanément afin d'estimer des paramètres relatifs au comportement d'un opérateur « moyen ».

#### *Distribution des paramètres par simulations de Monte Carlo*

L'estimation des paramètres des modèles se fait selon la procédure décrite dans le Tableau 20. Une itération de cette procédure fournit un jeu de paramètres. 5000 itérations ont été conduites afin d'obtenir une distribution empirique des paramètres du modèle.

**Tableau 20. Procédure d'estimation des paramètres**

Système	Paramètre estimé	Notation	Calcul	Observation
<b>Commun</b>	$q_{sm}$	$\hat{q}_{sm}$	Normal( $d/500 ; 0,3$ )	Tirage au sort dans cette distribution
	$es_m$	$e\hat{s}_m$	$= \frac{q_f \times es_{f_0}}{q_f + q_{sm}}$	Déduction depuis (E1)
<b>Classique</b>	$q_{ms}$	$\hat{q}_{ms}$	$= \frac{m\hat{s}_s}{e\hat{s}_m}$	Déduction depuis (E2)
	$q_{fm}$	$\hat{q}_{fm}$	$= \hat{m} + q_{ms}$	Déduction depuis (E3)
	$q_{se}$	$\hat{q}_{se}$	$= -\hat{s} - q_{se}$	Déduction depuis (E4)
<b>Sécurisé</b>	$q_{me}$	$\hat{q}_{me}$	$= \frac{m\hat{s}_e}{e\hat{s}_m}$	Déduction depuis (E2')
	$q_{fm}$	$\hat{q}_{fm}$	$= \hat{m} + q_{me}$	Déduction depuis (E3')
	$q_{se}$	$\hat{q}_{se}$	$= \hat{e}$	Déduction depuis (E4')

### **5) Simulation de la contamination croisée**

La contamination croisée résulte du transfert de microorganismes d'un produit à l'autre par l'intermédiaire de la matière. Ainsi, au cours d'un échange de matière entre deux compartiments du modèle, on calcule le nombre de microorganismes transférés en fonction de la concentration dans les compartiments et des quantités de matière transférées. De plus, la simulation de la contamination croisée au cours des soins manuels nécessite le choix d'un scénario dont on veut évaluer l'impact en termes de contamination croisée. Enfin, l'implémentation des simulations peut être déterministe ou stochastique.

a. Calcul des concentrations et nombre de microorganismes transférés

La modélisation du transfert de matière se base sur les systèmes (S1) et (S2) présentés précédemment. Dans le cadre de la simulation de la contamination croisée, la matière présente dans un compartiment du modèle est contaminée avec des microorganismes. Lorsqu'un transfert de matière s'opère entre deux compartiments, des microorganismes contenus dans cette matière sont aussi transférés. Le nombre de microorganismes transférés dépend de la concentration en microorganismes dans le compartiment d'origine et de la quantité de matière transférée dans le compartiment d'arrivée.

Soit  $c_i(t)$  la concentration bactérienne dans le compartiment  $C_i$  au temps  $t$  et  $q_i(t)$  la quantité de matière dans  $C_i$  à l'instant  $t$ . Soit  $q_{ij}$  la quantité de matière transférée de  $C_i$  vers  $C_j$ . Le nombre moyen  $n_{ij}$  de microorganismes transférés de  $C_i$  vers  $C_j$  est  $q_{ij} \times c_i(t)$ . Initialement, seule la concentration des produits initialement contaminés est positive.

*Sous-système 1*

Dans le cadre du système classique, trois transferts de matière s'opèrent simultanément au cours du soin du fromage  $i$  : de la solution vers les mains, des mains vers la solution, de la solution vers l'environnement.

- Si le transfert de matière s'opère à sens unique, de  $C_i$  vers  $C_j$ , les concentrations dans ces compartiments à l'instant  $t+1$  (après le transfert) sont les suivantes :

$$c_i(t+1) = c_i(t) \text{ et } c_j(t+1) = \frac{c_j(t) \times (q_j(t) + q_{ij})}{q_i(t) + q_{ij}}.$$

Ce calcul s'applique au cas du transfert entre la solution et l'environnement dans le cadre du système classique et au cas du transfert entre la solution et la main dans le cadre du système sécurisé.

- Si un compartiment reçoit de la matière depuis  $n$  compartiments simultanément et à sens unique, depuis  $C_i$  et  $C_j$  vers  $C_k$ , pour  $n=2$ , les concentrations dans ces compartiments à l'instant  $t+1$  (après le transfert) sont les suivantes :

$$c_i(t+1) = c_i(t), c_j(t+1) = c_j(t) \text{ et } c_k(t+1) = \frac{c_k(t) \times q_k(t) + c_i(t) \times q_{ik} + c_j(t) \times q_{jk}}{q_k(t) + q_{ik} + q_{jk}}.$$

Ce calcul s'applique au cas du transfert depuis la solution et les mains vers l'environnement dans le cadre du système sécurisé.

- Si le transfert de matière s'opère à double sens, de  $C_i$  vers  $C_j$  et inversement, les concentrations dans ces compartiments à l'instant  $t+1$  (après le transfert) sont les suivantes :

$$c_i(t+1) = \frac{c_i(t) \times (q_i(t) - q_{ij}) + c_j(t) \times q_{ji}}{q_i(t) - q_{ij} + q_{ji}} \text{ et } c_j(t+1) = \frac{c_j(t) \times (q_j(t) - q_{ji}) + c_i(t) \times q_{ij}}{q_j(t) - q_{ji} + q_{ij}}.$$

Ce calcul s'applique au cas du transfert entre la solution et les mains dans le cadre du système classique.

### *Sous-système 2*

Dans le système mains/produit, l'homogénéisation des matières des compartiments en présence a lieu avant la répartition du mélange entre les deux compartiments.

La concentration  $c$  résultant de l'homogénéisation des matières des deux compartiments  $C_i$  et  $C_j$ , dans lesquels les quantités de matière sont respectivement  $q_i(t)$  et  $q_j(t)$  et les concentrations,  $c_i(t)$  et  $c_j(t)$ , à l'instant  $t$  (avant homogénéisation) est :

$$c = \frac{q_i(t) \times c_i(t) + q_j(t) \times c_j(t)}{q_i(t) + q_j(t)}$$

Après homogénéisation, les quantités  $q_{ij}$  et  $q_{ji}$  ( $q_{ji} = q_i(t) + q_j(t) - q_{ij}$ ) du mélange sont transférées aux compartiments  $C_i$  et  $C_j$  respectivement. Les nombres moyens de microorganismes dans ces compartiments sont respectivement égaux à  $c \times q_{ij}$  et  $c \times q_{ji}$  et la concentration après transfert dans ces deux compartiments est  $c$ .

Ce calcul s'applique au transfert de matière entre les mains et la surface du produit.

### **b. Implémentation des simulations**

Les simulations sont implémentées de manière stochastique. Il existe deux sources de variabilité des résultats des simulations.

A l'instar du modèle de contamination croisée au cours des soins mécaniques, les paramètres représentant les quantités de matière transférées proviennent des distributions empiriques estimées précédemment. Pour tenir compte du fait que les paramètres estimés sont interdépendants, un jeu de paramètres est tiré au sort dans leur distribution empirique conjointe fournissant la première source de variabilité des résultats.

La deuxième source de variabilité provient du calcul du nombre de microorganismes transférés. Le processus aléatoire associé au comptage des bactéries réparties de manière homogène dans un volume  $v$  de concentration  $c$  est le processus poissonien. Ainsi, le nombre moyen  $n$  de microorganismes d'un volume  $v$ , dont la concentration en microorganismes est  $c$  suit une loi de distribution de Poisson de paramètre  $c \times v$ . L'utilisation de cette loi pour calculer le nombre de bactéries transférées permet de tenir compte de la variabilité intrinsèque de ce nombre et de calculer des nombres entiers de microorganismes transférés.

### c. Choix d'un scénario

Dans le cadre des soins manuels classiques, le nombre de fromages soignés par opérateur est limité par la quantité de solution qs présente initialement dans le récipient. En conditions réelles, qs s'élève à 1500 grammes et le nombre de fromages soignés par opérateur entre deux mesures d'hygiène est de 125. Nous avons donc choisi de simuler les soins d'une série de 125 fromages.

Le scénario de contamination initiale fournit le rang des fromages initialement contaminés, ainsi que la concentration initiale en microorganismes par gramme de la biomasse provenant de la surface du produit et sollicitée pendant les soins, les microorganismes étant répartis uniformément dans la biomasse. Le scénario choisi est le suivant : le dixième fromage de la série de 125 fromages est contaminé avec une concentration initiale variant sur une échelle logarithmique de  $10^1$  à  $10^6$  bactéries par gramme.

Ces scénarios ont été appliqués aux modèles de soins manuels, classiques et sécurisés, ainsi qu'au modèle de soins mécaniques dans un objectif de comparaison des trois systèmes de soins.

## B. Résultats

### 1) Expérimentations

#### *Soins manuels classiques*

La différence de masse d des 500 fromages pesés avant et après soins s'élève à 1332 g. La Figure 33-(a) et la Figure 33-(b) représentent, pour chacun des quatre opérateurs, l'évolution des masses de matière totale présente dans les récipients et sur les gants. Le produit de la quantité de matière totale dans le récipient par le pourcentage d'extrait sec fournit la quantité de matière sèche présente dans la solution, dont l'évolution pour chaque opérateur est représentée sur la Figure 33-c. Après le passage des 300 fromages, la masse de matière récupérée dans les conteneurs s'élève à 1406 g.

#### *Soins manuels sécurisés*

La différence de masse d des 500 fromages pesés avant et après soins s'élève à 598 g. Le

Tableau 21 fournit les résultats relatifs aux mesures effectuées après le soin de 50 fromages par quatre opérateurs. Le produit de la quantité de matière totale dans le récipient par le pourcentage d'extrait sec fournit la quantité de matière sèche présente dans la solution du bac de récupération. Le comportement de l'opérateur 4 s'éloigne significativement de celui des autres opérateurs, mais nous avons choisi de conserver ses données expérimentales pour l'estimation des paramètres.

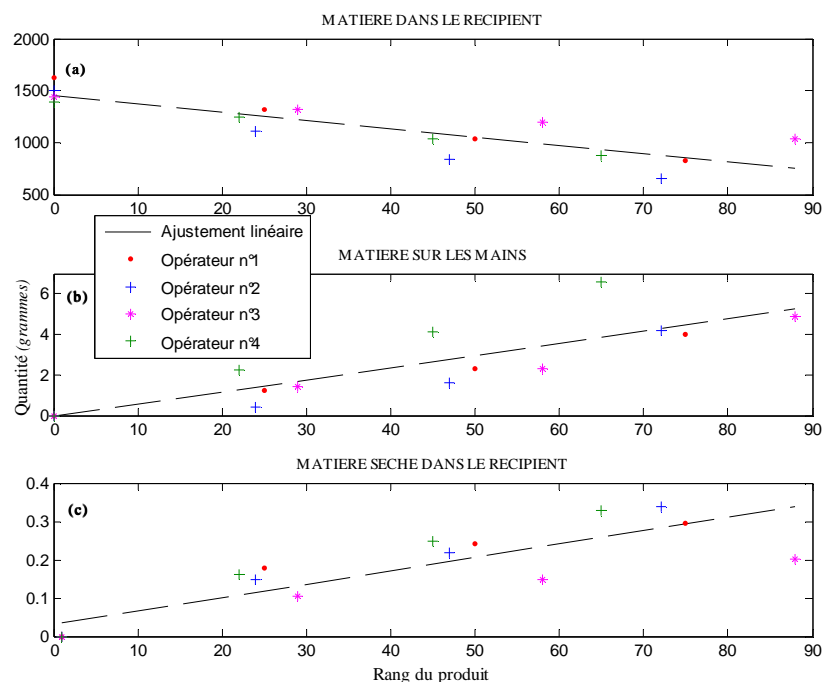


Figure 33. Evolution des quantités de matière et de matière sèche pour les soins manuels classiques

Tableau 21. Mesures des quantités de matière et de matière sèche pour les soins manuels sécurisés

N° opérateur	Nombre de produits soignés	Quantité de matière sur les mains (g)	Quantité de matière sèche dans l'environnement (g)	Quantité de matière dans l'environnement (g)
1	50	2,32	0,02	50
2	50	2,18	0,02	58
3	50	1,76	0,02	88
4	49	2,1	0,09	380

## 2) Estimation des paramètres

L'apport moyen de solution par produit s'élève à  $\frac{d}{500}$ , c'est-à-dire, 2,66 grammes, pour les soins classique et 1,19 grammes pour les soins sécurisés. La quantité de matière totale transférée à la surface du fromage  $\hat{q}_{sm}$  est une réalisation de la loi de distribution normale de moyenne  $\frac{d}{500}$  et d'écart-type 0,3 gramme.

Les résultats des ajustements linéaires sur les mesures expérimentales (données d'évolution des quantités de matière dans les différents compartiments) couplées aux valeurs des variables en conditions initiales (quand  $i = 1$  ou 0 en fonction des variables considérées) sont résumés dans le Tableau 22. Pour chaque estimation sont fournies la pente de la régression linéaire ainsi que la qualité d'ajustement du modèle ( $R^2$ ). Pour les soins manuels classique, les ajustements linéaires sont graphiquement représentés sur la Figure 33. Sont alors calculés successivement les paramètres du modèle selon la procédure décrite dans le Tableau 20. Les 5000 itérations ont



fournit un jeu de paramètres dont les valeurs sont interdépendantes. Le Tableau 23 résume les distributions empiriques des paramètres en fournissant leur moyenne et l'intervalle de confiance au niveau 95%.

**Tableau 22. Qualité d'ajustement et pentes de modèles linéaire ajustés aux données expérimentales**

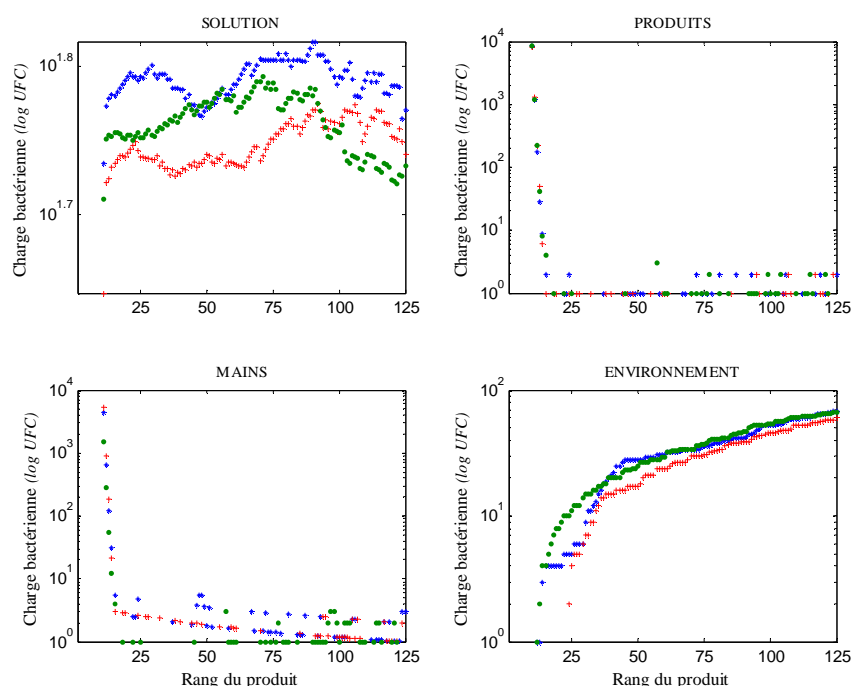
Paramètre estimé	Classique		Sécurisé	
	R <sup>2</sup>	Pente	R <sup>2</sup>	Pente
$\hat{m}$	0,75	$6,03.10^{-2}$	0,98	$4,19.10^{-2}$
$\hat{s}$	0,72	-7,96	-	-
$m\hat{s}_s$	0,74	$3,47.10^{-3}$	-	-
$m\hat{s}_e$	-	-	0,38	$7,57.10^{-4}$
$\hat{e}$	-	-	0,34	2,84

**Tableau 23. Moyenne et intervalle de confiance à 95% des paramètres des modèles**

Type de soins	Estimation de la valeur des paramètres (grammes)				
	q <sub>se</sub>	q <sub>sm</sub>	q <sub>ms</sub>	q <sub>me</sub>	q <sub>fm</sub>
Classique	5,30 [4,69 ; 5,90]	2,66 [2,06 ; 3,26]	$5,04.10^{-2}$ [ $4,09.10^{-2}$ ; $6,00.10^{-2}$ ]	-	$1,10.10^{-1}$ [ $1,01.10^{-2}$ ; $1,20.10^{-2}$ ]
Sécurisé	2,88	1,19 [0,22 ; 2,17]	-	$5,90.10^{-3}$ [ $2,50.10^{-3}$ ; $9,30.10^{-3}$ ]	$4,78.10^{-2}$ [ $4,45.10^{-3}$ ; $5,12.10^{-3}$ ]

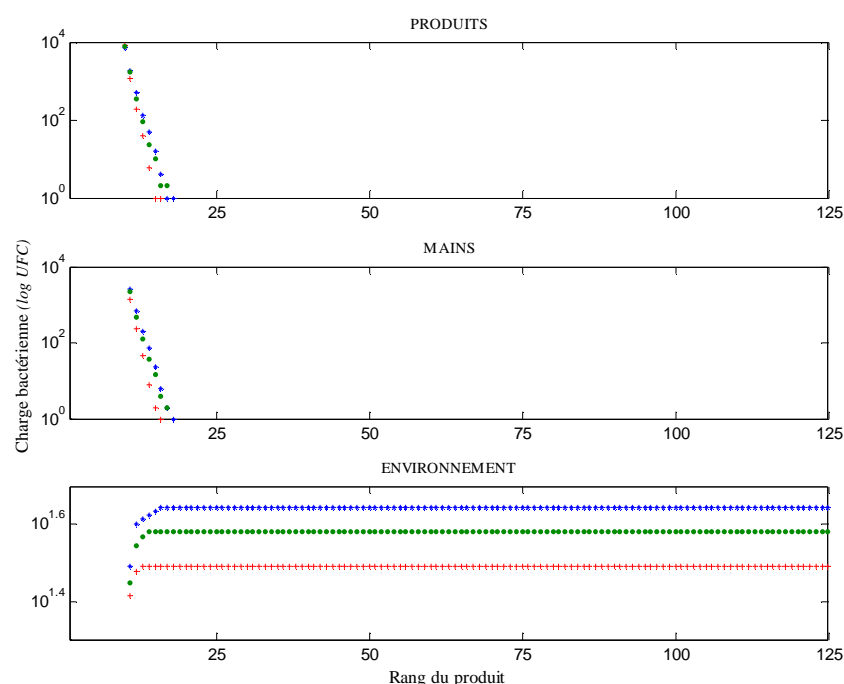
### 3) Simulation de la contamination croisée

Pour le scénario choisi (le dixième produit d'une série de 125 produits est contaminé en surface), nous avons choisi de représenter l'évolution des charges bactériennes de chacun des compartiments pour une concentration initiale du produit contaminé égale à  $10^4$  bactéries par gramme (Figure 34 pour les soins classiques et Figure 35 pour les soins sécurisés). Trois itérations utilisant chacune des jeux de paramètres aléatoires, tirés au sort dans leur distribution empirique jointe ont été effectués. Une couleur correspond aux résultats d'une itération. Les charges bactériennes sont représentées sur une échelle logarithmique et l'axe des abscisses correspond au rang des produits. La solution étant toujours neuve dans le cas des soins manuels sécurisés, ce compartiment n'est pas représenté.



**Figure 34.** Evolution des charges bactériennes dans les compartiments du modèle de soins manuels classiques. Le 10<sup>ème</sup> produit d'une série de 125 est contaminé avec une concentration de 10<sup>4</sup> bactéries par grammes.

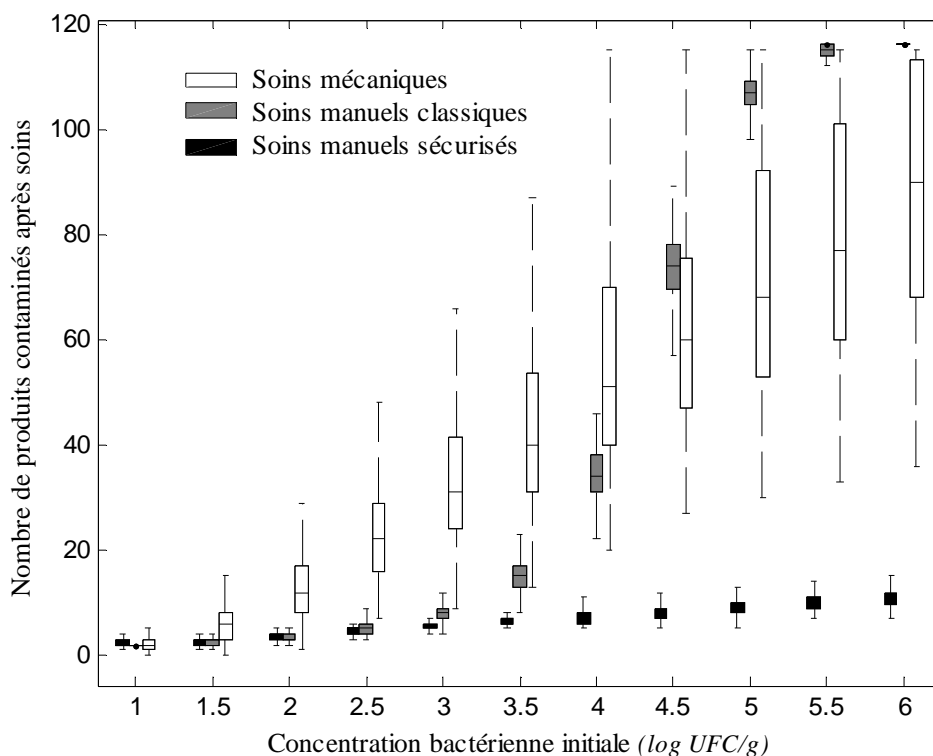
Pour les deux types de soins, on observe au passage du dixième produit une contamination de la main, engendrant immédiatement la contamination des produits, de la solution et de l'environnement. Par la suite, dans le cas des soins classiques, c'est principalement par l'intermédiaire de la solution que les produits et l'environnement sont contaminés, de manière sporadique et avec de faibles charges bactériennes. A la fin de la série, le nombre de produits contaminés augmente du fait d'une faible quantité de solution restante, dont la concentration en microorganismes augmente. Dans le cas des soins sécurisés, les produits et l'environnement ne sont plus contaminés lorsque la main n'est plus contaminée. Dans les deux cas, les fluctuations de l'évolution des charges bactériennes sont dues au nombre aléatoire de cellules transférées, calculé avec le processus poissonien.



**Figure 35. Evolution des charges bactériennes dans les compartiments du modèle de soins manuels sécurisés. Le 10<sup>ème</sup> produit d'une série de 125 est contaminé avec une concentration de 10<sup>4</sup> bactéries par grammes.**

La comparaison des résultats des simulations pour ces deux procédés met en évidence le gain de sécurité obtenu par le passage du procédé classique au procédé sécurisé. Nous avons cherché à quantifier ce gain de sécurité de manière plus approfondie à travers l'étude du nombre final de produits contaminés et de la répartition des charges bactériennes de ces produits. La comparaison des résultats a été élargie au cas des soins mécaniques.

Pour cela, nous avons observé le nombre de produits contaminés pour des concentrations du produit initialement contaminé de  $10^1$  à  $10^6$  bactéries par gramme. Pour les trois procédés étudiés, 500 itérations ont été conduites pour chaque concentration de  $10^1$  à  $10^6$  bactéries par gramme. Chaque simulation utilise un jeu de paramètres tiré aléatoirement dans leur distribution empirique jointe, et le nombre de bactéries transférées à chaque transfert de matière est calculé selon le processus poissonien. La Figure 36 représente l'évolution du nombre de produits contaminés en fonction du logarithme décimal de la concentration initiale du produit contaminé de rang  $i = 10$ .



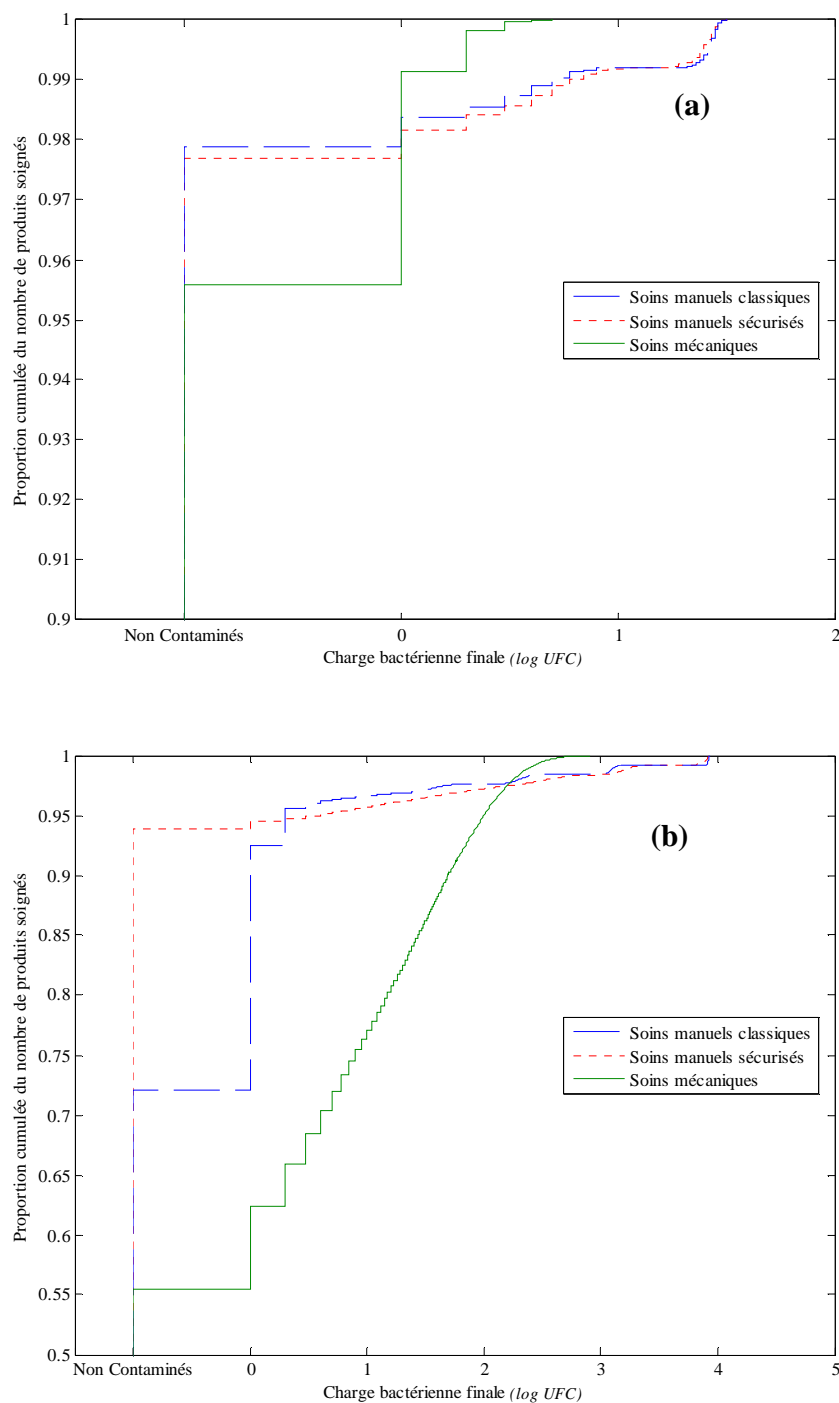
**Figure 36. Evolution du nombre de produits contaminés en fonction de la concentration initiale du produit initialement contaminé. Les boîtes à moustache fournissent la médiane, les interquartiles (25% et 75%) et l'étendue de la distribution du nombre de produits contaminés.**

Pour les soins manuels classiques, la moyenne et la variance du nombre de produits contaminés augmentent de manière exponentielle pour une concentration initiale inférieure à  $10^{4.5}$  bactéries par gramme. Pour une concentration initiale supérieure à  $10^{4.5}$  bactéries par gramme, le nombre maximal de produits contaminés est de 115, le fromage initialement contaminé étant de rang 10, impliquant une diminution de la moyenne et de la variance du nombre de produits contaminés. Par contre, la moyenne et la variance des produits contaminés au cours des soins manuels sécurisés augmentent très peu. Les soins mécaniques constituent une situation intermédiaire pour le risque de contamination croisée: la moyenne et la variance augmentent linéairement sur une échelle logarithmique avec la concentration du fromage initialement contaminé.

Ces résultats montrent aussi que le gain de sécurité lors du passage des soins manuels classiques aux soins manuels sécurisés, en termes de nombre final de produits contaminés, ne semble effectif qu'à partir d'une certaine concentration. Un test de Student permettant de comparer les moyennes du nombre de produits contaminés après soins, pour chaque concentration initiale, montre que la moyenne du nombre de produits contaminés au cours des soins manuels classiques est inférieure à celle du nombre de produits contaminés au cours des soins manuels sécurisés pour les concentrations initiales inférieures à  $10^2$  bactéries par gramme ( $p < 0,001$ ). Ceci peut s'expliquer par le fait que, dans le cadre des soins classique, la main contaminée par la

surface d'un produit contaminé dépose une partie des cellules dans la bassine contenant la solution. La faible concentration en bactéries dans la solution de soins et l'homogénéisation des cellules dans la solution implique que peu de cellules sont redistribuées sur les fromages suivants. Ces résultats montrent que, dans le cadre d'une contamination par un germe pathogène, souvent en faible concentration, le passage de l'ancien au niveau système de soins ne permet pas de diminuer le risque de contamination microbiologique des fromages.

Pour chacune des concentrations initiales égales à  $10^{1.5}$  et  $10^4$  bactéries par gramme, les charges bactériennes de l'ensemble des produits contaminés après les soins à l'issue des 500 simulations ont été compilées et nous avons observé leur distribution empirique parmi les fromages contaminés (Figure 37). L'axe des ordonnées représente la proportion cumulée de produits pour différentes classes de concentrations finales, représentées sur l'axe des abscisses à l'échelle logarithmique.



**Figure 37 Répartition des charges bactériennes sur les produits après soins. (a) La concentration initiale du produit contaminant est  $10^{1.5}$  bactéries par gramme. (b) La concentration initiale du produit contaminant est  $10^4$  bactéries par gramme.**

Ces résultats confirment les résultats précédents : la proportion de produits non contaminés varie relativement peu d'un type de soins à l'autre pour une concentration initiale de  $10^{1.5}$  CFU/g. Concernant la répartition des

charges bactériennes des produits contaminés pour une concentration initiale égale à  $10^4$  CFU/g, on observe que le passage des soins classiques aux soins sécurisés permet la disparition des produits contaminés avec une seule bactérie par gramme (20% des produits contaminés) et donc d'augmenter la proportion de produits non contaminés de 73% à 93%. Par contre, les proportions de produits dont la concentration est supérieure à 1 bactérie par gramme sont comparables pour les deux procédés de soins manuels, classiques et sécurisés. Concernant les soins mécaniques, les différentes classes de concentrations sont réparties de manière uniforme parmi les produits contaminés.

## C. Discussion

La modélisation de la contamination croisée fait l'objet d'un intérêt grandissant dans le contexte de l'appréciation quantitative du risque (Aziza et al., 2006; Nauta et al., 2005b). La structure du présent modèle pour modéliser la contamination croisée lors des soins manuels confirme l'intérêt de l'approche compartimentale et basée sur le transfert de matière, déjà utilisée pour les soins mécaniques. Les paramètres du présent modèle sont des quantités de matière transférée d'un compartiment à l'autre, contrairement au modèle concernant les soins mécaniques, dont les paramètres correspondaient à des proportions de biomasse transférée et étaient basés sur la quantification de la population microbienne. Cela montre les diverses possibilités d'adaptation d'une telle structure compartimentale à un procédé.

Les expérimentations ont permis d'obtenir un ordre de grandeur des paramètres du modèle, bien que l'incertitude sur les paramètres soit encore réductible, en augmentant le nombre de répétitions des expériences, notamment pour le modèle de soins sécurisés. L'ajustement de modèles linéaires sur les courbes d'évolution de la matière et de la matière sèche des compartiments concernés a été effectué sur les données des quatre opérateurs simultanément afin d'estimer des paramètres relatifs au comportement d'un opérateur « moyen ». Ainsi, seule l'incertitude sur la quantité de solution apportée au produit a été prise en compte. Certaines hypothèses du modèle doivent être explorées :

- celle affirmant que les quantités de matière transférées sont constantes au cours du temps, malgré le fait que les ajustements des régressions linéaires, confirmant cette hypothèse, étaient de bonne qualité (4 valeurs de  $R^2$  parmi 5 étaient supérieures à 0.74)
- celle concernant l'homogénéisation des bactéries dans la matière après chaque transfert. En effet, les bactéries peuvent former des agrégats, dus à la croissance, auquel cas, le nombre de bactéries transférées n'est plus la réalisation d'une loi de poisson.

La présente étude confirme l'intérêt de l'approche proposée dans le cadre des soins mécaniques, basée sur la modélisation du transfert de matière lors du soin des produits. De plus, cette approche permet son application à

divers microorganismes, pathogènes ou autres germes d'altération contaminants mais non pathogènes. Par conséquent, les objectifs d'un tel modèle sont multiples : évaluer le risque de contamination croisée par un germe pathogène (cas rare, et population généralement faible) ou par un germe d'altération (cas plus fréquent, et population souvent plus élevée). La comparaison de différents procédés ne donnera pas forcément le même résultat pour ces deux types de flore, puisque l'écart entre les procédés dépend du niveau de population initial. Ainsi, lors du passage du procédé classique au procédé sécurisé, le risque ne semble pas réellement réduit pour de faibles niveaux de contamination par un microorganisme.

### III. Appendice

#### APPENDIX A

The system (S) describes the number of CFU in a compartment after the cheese with rank  $i$  has been brushed.

$$(S) \begin{cases} m(0) = e(0) = 0 \\ m(i) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(i-1) + p_{cm} \times c(i)_0, i \geq 1 \\ e(i) = e(i-1) + p_{me} \times m(i-1), i \geq 1 \\ c(i)_1 = (1 - p_{cm}) \times c(i)_0 + p_{mc} \times m(i-1), i \geq 1 \\ 0 < p_{cm}, p_{mc}, p_{me} < 1; p_{mc} + p_{me} < 1 \end{cases}$$

In the case  $i = 1$ , as  $m(0) = 0$ ,  $c(1)_1 = (1 - p_{cm}) \times c(1)_0$  (A.1).

Hence,  $p_{cm} = 1 - \frac{c(1)_1}{c(1)_0} \Leftrightarrow p_{cm} = 1 - 10^{\log(c(1)_1) - \log(c(1)_0)}$  (1). Moreover,  $m(1) = p_{cm} \times c(1)_0$ .

In the case  $i = 2$ , as  $c(2)_0 = 0$ ,  $c(2)_1 = p_{mc} \times m(1) \Leftrightarrow c(2)_1 = p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0$  (A.2)

and  $m(2) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(1) \Leftrightarrow m(2) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times p_{cm} \times c(1)_0$ .

In the case  $i \geq 3$ , as  $c(i)_0 = 0$ ,  $m(i) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(i-1)$  and  $c(i)_1 = p_{mc} \times m(i-1)$ .

Hence,  $c(i)_1 = p_{mc} \times (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(i-2)$ .

This recurrence relation easily gives  $c(i)_1 = p_{mc} \times (1 - p_{mc} - p_{me})^{i-2} \times m(1)$ .

As  $m(1) = p_{cm} \times c(1)_0$ ,  $c(i)_1 = (1 - p_{mc} - p_{me})^{i-2} \times p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0$  (A.3).

When applying  $i = 2$  to eq. (A.3),  $c(2)_1 = p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0$ , which is the same result as eq. (A.2). Thus, eq. (A.3) works for  $i \geq 2$ .

Switching over to the decimal logarithmic scale led to a linear relationship between  $\log(c(i)_1)$  and  $i$ ,  $i \geq 2$ :

$$\log(c(i)_1) = A + i \times B, i \geq 2 \quad (4).$$

A and B from eq. (4) are defined by the following system:



$$(S') \begin{cases} A = \log(p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0) - 2 \times \log(1 - p_{me} - p_{mc}) \\ B = \log(1 - p_{me} - p_{mc}) \end{cases}.$$

Finally, solving system (S') results in the following equations

$$\begin{cases} p_{mc} = 10^{A - \log(p_{cm} \times c(1)_0) + 2B} & (2) \\ p_{me} = 1 - 10^B - p_{mc} & (3) \end{cases}.$$

Eq. (4) makes it possible to obtain values on parameters A and B by means of a linear regression (least square fitting) between  $\log(c(i)_1)$  and  $i$ , as if  $i$  were a continuous variable and for  $i \geq 2$ . Eq. (1) makes it possible to assess  $p_{cm}$ . Finally, eq. (2) and (3) provides values of  $p_{me}$  and  $p_{mc}$ .

## APPENDIX B

Let  $I$  be the number of cross-contaminated cheeses from one initially contaminated with  $C$  CFU.  $I \in \{i \geq 2 / A + iB = 0\}$  since  $I$  is the last contaminated cheese and, for  $i \geq 2$ ,  $\log(c(i)_1) = A + iB$ .  $A$  and  $B$  are defined by system (S') (see appendix A). Deriving  $A + IB = 0$  as if  $I$  were continuous gives:

$$\begin{aligned} A + I \times B = 0 &\Leftrightarrow I = \frac{-A}{B} \\ &\Leftrightarrow I = \frac{-\log(p_{mc} \times p_{cm} \times C) + 2 \times \log(1 - p_{mc} - p_{me})}{\log(1 - p_{mc} - p_{me})} \quad (5) \\ &\Leftrightarrow I = 2 - \frac{\log(p_{mc} \times p_{cm} \times C)}{\log(1 - p_{mc} - p_{me})} \end{aligned}$$

## APPENDIX C

For scenario S1, indicator  $K$  corresponds to the number of cheeses brushed before the number of CFU on a cheese is reduced to 50% of the contaminant load of the first cross-contaminated cheese ( $i = 2$ ).

$$\text{Thus, } K = \left\{ i / c(i)_1 = \frac{c(2)_1}{2} \right\}, \text{ i.e. } K = \{i / \log(c(i)_1) = \log(c(2)_1) - \log(2)\}.$$

As  $\log(c(i)_1) = A + iB$ , for  $i \geq 2$  and  $c(2)_1 = p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0$  (see appendix A), we come to

$$K = \frac{\log(p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0) - \log(2) - A}{B}. \text{ According to system (S') of appendix A,}$$

$$K = \frac{\log(p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0) - \log(2) - \log(p_{mc} \times p_{cm} \times c(1)_0) + 2 \times \log(1 - p_{me} \times p_{mc})}{\log(1 - p_{me} \times p_{mc})}.$$

$$\text{Finally, } K = 2 - \frac{\log(2)}{\log(1 - p_{me} - p_{mc})} \quad (7)$$

## APPENDIX D

Let's calculate  $\frac{c(i)_1}{c(i)_0}$  for scenario S2, where all cheeses are contaminated with the contaminant load C, i.e.

$c(i)_0 = C, \forall i \geq 1$ . The reduction rate L is  $1 - \frac{c(i)_1}{C}$ .

According to system (S),  $\begin{cases} c(i)_1 = (1 - p_{cm}) \times c(i)_0 + p_{mc} \times m(i-1) \\ m(i) = (1 - p_{cm} - p_{me}) \times m(i-1) + p_{cm} \times c(i)_0 \end{cases}$ , for  $i \geq 1$ .

In the case where all cheeses are contaminated with the same load C, the recurrence equation for  $m(n)$ ,  $n \geq 2$

easily gives:  $m(n) = B_L^{n-1} \times m(1) + C \times p_{cm} \times \sum_{k=0}^{n-2} B_L^k$ , with  $B_L = 1 - p_{mc} - p_{me}$ .

As  $m(1) = p_{cm} \times C$  and  $\sum_{k=0}^j B_L^k = \frac{1 - B_L^{j+1}}{1 - B_L}$ ,  $m(n) = C \times p_{cm} \times \frac{1 - B_L^n}{1 - B_L}$ ,  $n \geq 0$ .

If  $n = i - 1$ , we obtain  $c(i)_1 = (1 - p_{cm}) \times C + p_{mc} \times \frac{1 - B_L^{i-1}}{1 - B_L}$ ,  $i \geq 1$ .

Thus,  $\frac{c(i)_1}{C} = 1 - p_{cm} + p_{mc} \times \frac{1 - B_L^{i-1}}{1 - B_L}$ ,  $i \geq 1$ .

And finally,  $L = p_{cm} - p_{mc} \times \frac{1 - B_L^{i-1}}{1 - B_L}$ ,  $i \geq 1$  (8)

## APPENDIX E

Démonstration par récurrence de l'équation (E1):

$$\begin{aligned} es\_m(1) &= \frac{f_0(1) \times es\_f_0(1)}{q_{sm} + f_0(1)} \\ &= \frac{qf \times es\_f_0}{q_{sm} + qf} \end{aligned}$$

Supposons que  $es\_m(i) = \frac{qf \times es\_f_0}{q_{sm} + qf}$ ,  $\forall i > 1$  et montrons que  $es\_m(i+1) = \frac{qf \times es\_f_0}{q_{sm} + qf}$ .

Sous l'hypothèse que  $es\_s(i) \times q_{sm} = 0$ ,

$$\begin{aligned} es\_m(i+1) &= \frac{f_0(i+1) \times es\_f_0(i+1) + m(i) \times es\_m(i)}{q_{sm} + f_0(i+1) + m(i)} \\ &= \frac{f_0(i+1) \times es\_f_0(i+1) + m(i) \times \frac{qf \times es\_f_0}{q_{sm} + qf}}{q_{sm} + f_0(i+1) + m(i)} \end{aligned}$$

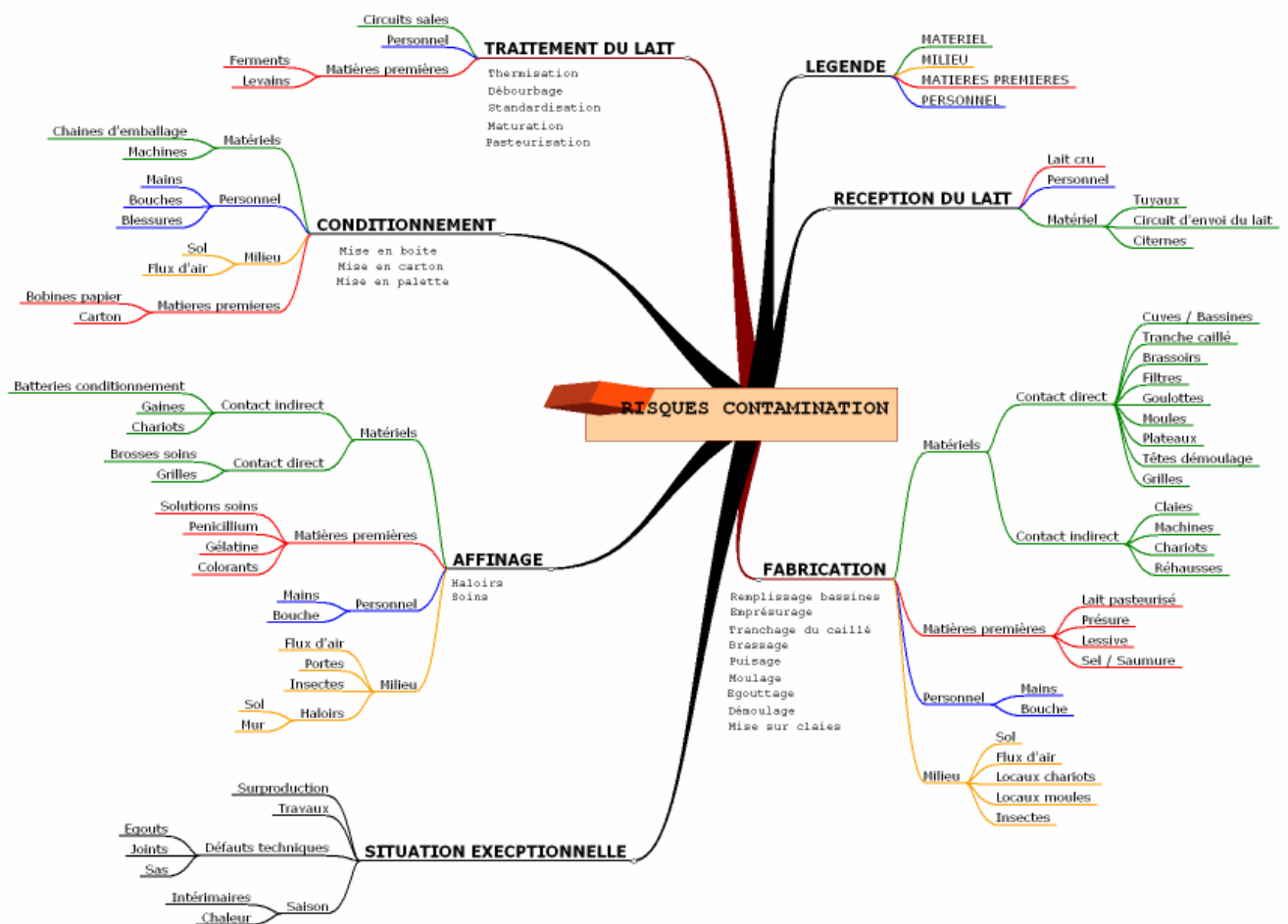
$$\begin{aligned}
&= \frac{(\mathbf{qf} \times \mathbf{es\_f_0}) \times (\mathbf{qf} + \mathbf{q_{sm}}) + \mathbf{m(i)} \times (\mathbf{qf} \times \mathbf{es\_f_0})}{(\mathbf{q_{sm}} + \mathbf{qf} + \mathbf{m(i)}) \times (\mathbf{qf} + \mathbf{q_{sm}})} \\
&= \frac{(\mathbf{qf} \times \mathbf{es\_f_0}) \times (\mathbf{qf} + \mathbf{q_{sm}} + \mathbf{m(i)})}{(\mathbf{q_{sm}} + \mathbf{qf} + \mathbf{m(i)}) \times (\mathbf{qf} + \mathbf{q_{sm}})} \\
&= \frac{\mathbf{qf} \times \mathbf{es\_f_0}}{\mathbf{qf} + \mathbf{q_{sm}}}
\end{aligned}$$

Donc,  $\mathbf{es\_m(i)} = \mathbf{es\_m} = \frac{\mathbf{qf} \times \mathbf{es\_f_0}}{\mathbf{q_{sm}} + \mathbf{qf}}, \forall \mathbf{i} .$

## CHAPITRE V

# Etude des Facteurs de Risque de Listériose liés à la Consommation de Fromages à Pâte Molle au Lait Pasteurisé à Travers un Modèle d'Appréciation de l'Exposition

Le procédé de fabrication des fromages à pâte molle induit de multiples possibilités de contamination microbiologique autre que par la matière première. Un inventaire non exhaustif des sources et vecteurs de contamination à chacune des étapes du procédé de fabrication est fourni dans la Figure 38. Parmi ces étapes, la plus importante et la plus longue est l'affinage, lors duquel les fromages sont entreposés dans les hâloirs pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines, et subissent ponctuellement des soins dans le cas des fromages à croûte lavée. C'est cette étape qui constitue le plus grand risque de contamination secondaire, notamment dans le cas des fromages à pâte molle à croûte lavée (cf. Chapitre IV). De plus, la production industrielle de fromages nécessite une organisation complexe, basée sur le fait que plusieurs lots de produits, dont les procédés de fabrication peuvent différer (notamment au niveau de la durée et la température d'affinage), cohabitent au sein de salles d'affinage (hâloirs) communes. Cela implique que les lots ne peuvent pas être considérés comme indépendants en termes de contamination microbienne.



**Figure 38 Sources et vecteurs de contamination à chacune des étapes du procédé de fabrication des fromages à pâte molle au lait pasteurisé**

Cette complexité, tant au niveau organisationnel qu’au niveau du procédé de fabrication implique la mise en place de mesures de maîtrise visant à prévenir et détecter la contamination microbiologique des produits et de l’environnement. De plus, un plan d’action en cas de détection de la présence d’un microorganisme indésirable doit être prévu pour rétablir la situation hygiénique.

Nous présentons un modèle d’appréciation de l’exposition des fromages à pâte molle au lait pasteurisé à *L. monocytogenes*. La matière première étant supposée exempte de tout microorganisme indésirable, l’hypothèse est faite que l’environnement de l’industrie fromagère, les phénomènes de contaminations secondaires et le comportement microbien résultant des paramètres physico-chimiques environnementaux participent à l’évolution de la prévalence et du niveau de contamination des unités de production au cours du procédé de fabrication.

Partant d'une primo-contamination de l'environnement de l'usine un jour donné, le modèle simule la dispersion des bactéries dans l'environnement et au sein des unités de production au cours du temps. Les étapes du procédé de fabrication des fromages à pâte molle au lait pasteurisé ont été standardisées dans un objectif d'adaptation du modèle à différents types de fromages. Tous les phénomènes décrits dans le Chapitre III ont pu être pris en compte, grâce notamment à l'utilisation de la structure de modélisation proposée dans ce même chapitre pour la modélisation du niveau de contamination d'un élément solide. Le modèle permet l'estimation du niveau de contamination des produits finis et de l'environnement.

Le modèle intègre deux types de mesures de maîtrise: les opérations d'hygiène et les auto-contrôles. Leurs caractéristiques d'application (fréquence et intensité) sont susceptibles d'évoluer en cas de détection d'une contamination (mesures correctives).

Les caractéristiques de la primo-contamination, des mesures de maîtrise et du procédé de fabrication sont définies initialement par un utilisateur souhaitant évaluer les conséquences de cette primo-contamination à plus ou moins long terme ou encore l'efficacité des mesures de maîtrise.

Nous avons adopté l'approche stochastique, dont les avantages ont été décrits précédemment (Chapitre I). Le modèle est mis en œuvre par simulations de Monte Carlo. A la différence de la plupart des modèles d'appréciation de l'exposition et du risque, proposant une loi de distribution pour le niveau de contamination de la matière première dont on simule l'évolution au cours du temps, le présent modèle considère seulement l'incertitude et la variabilité provenant, d'une part, des données utilisées pour l'estimation de certains paramètres du modèle, qui suivent une loi de distribution de probabilité; d'autre part, de la dispersion naturelle d'une mesure ou de la dispersion des résultats d'une expérience aléatoire décrite par des processus stochastiques connus. Nous explicitons autant que possible ces sources d'incertitude et de variabilité dans l'objectif d'une analyse de sensibilité mettant en évidence leur impact sur les résultats.

Les objectifs de l'étude sont multiples :

- Intégrer l'ensemble des phénomènes susceptibles d'avoir un impact sur la contamination microbiologique des produits en sortie d'usine,
- Construire un modèle dynamique, résultant de l'interaction de multiples processus se développant sur des temps et des espaces différents,
- Mettre en évidence les principaux facteurs augmentant la probabilité de présence d'un danger dans un aliment
- Optimiser les mesures de maîtrise des dangers.

# I. Description du modèle

## A. Configuration de l'usine

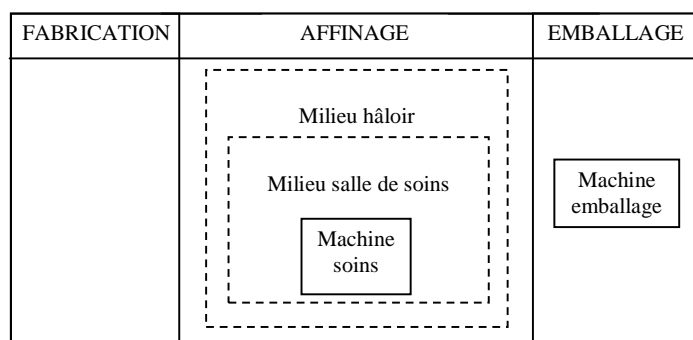
La configuration spatiale de l'usine se découpe suivant les trois principales phases du procédé de fabrication : la fabrication, l'affinage et l'emballage. Les environnements associés à chaque phase sont supposés indépendants, c'est-à-dire qu'un microorganisme présent dans l'environnement d'une zone donnée ne peut contaminer l'environnement d'une autre zone. Cette hypothèse s'appuie sur le fait qu'un grand nombre de précautions hygiéniques sont prises lors du passage du personnel et des produits d'une zone à l'autre, et que les produits évoluent dans ces environnements selon le principe de la marche en avant. Ainsi, des produits se trouvant à des phases différentes du procédé ne se croisent pas.

L'environnement d'une zone est modélisé selon une configuration simplifiée. Chaque environnement est composé de surfaces, réparties dans deux catégories distinctes : les *machines*, comprenant les surfaces en contact avec les produits en cours de production, et le *milieu*, comprenant les surfaces qui sont en contact indirect avec les produits tels que les sols et les murs. *Milieu*, *machines* et *unités de production d'un même ensemble* constituent les *compartiments* d'une étape du procédé de fabrication entre lesquels l'échange de microorganismes a lieu. L'échange de microorganismes se produit entre les différents compartiments d'une étape.

Dans la réalité, la zone d'affinage est composée de plusieurs hâloirs et d'une salle de soins, contenant une machine de soins (Figure 39). Cette configuration a été simplifiée comme suit : on considère un hâloir unique, dont le milieu constitue l'unique environnement ; à l'intérieur de ce hâloir se trouve une salle de soins, pour sa part constituée du milieu de la salle et de la machine de soins (Figure 40). L'environnement de la phase de fabrication n'est pas considéré dans cette étude car les connaissances sur les mécanismes de transfert à cette étape sont limitées. En phase d'emballage, l'environnement simplifié est constitué de la machine d'emballage.

FABRICATION	AFFINAGE			EMBALLAGE
Salle de fabrication	Hâloir 1		Hâloir 3	Salle d’emballage avec machine
	Couloir			
	Hâloir 2	Salle de soins avec machine	Hâloir 4	

Figure 39 Configuration réelle de l'usine



**Figure 40. Configuration simplifiée de l'usine**

Pour chaque grande phase, l'échange de cellules se produit entre les différents compartiments de l'environnement et celui constitué des unités de production présentes dans cette phase.

## B. Description des étapes

Le procédé de fabrication décrit par le modèle démarre après la pasteurisation, suite à laquelle le lait est supposé exempt de tout microorganisme pathogène. Cette hypothèse se réfère aux résultats de travaux réalisés au cours de cette thèse, sur la thermorésistance de *Listeria* et les barèmes thermiques appliqués lors de la pasteurisation, et dont les résultats ne sont pas présentés dans ce rapport. Pour chacune des quatre grandes phases de la vie du produit (fabrication, affinage, emballage, transport et conservation), un nombre fixe d'étapes est considéré.

### 1) Procédé de fabrication

Le procédé de fabrication a été simplifié de la manière suivante (Tableau 24):

La phase de fabrication est l'étape de transformation du lait pasteurisé en fromage frais: Le lait est réparti dans des bassines (*pré emprésurage*), emprésuré, puis se transforme en caillé (*post emprésurage*), qui est alors moulé pour prendre une forme de fromage (*moulage*). Suite au moulage, les produits sont transférés dans une salle d'égouttage au cours de laquelle le sérum s'écoule des produits (* gouttage*). Les produits peuvent alors être stockés dans divers hâloirs, dits d'acidification ou de refroidissement (*acidification* et *refroidissement*), puis salés dans des bacs de saumure (*saumurage*) ou avec du sel sec (*salage*). Les produits peuvent ensuite subir les étapes de *séchage* et/ou de *levuration*.

Le produit résultant est alors transféré en zone d'affinage. L'affinage est constitué d'une alternance entre étape de *maturation* en hâloir et étape de *soins*. Pendant cette période les produits sont déplacés de nombreuses fois de salles en salles. Dans le modèle, la phase d'affinage commence par une étape de soins et se termine par une étape de maturation en hâloir, suivie d'une ultime étape de maturation dans un hâloir dit « de pré-emballage » (*pré-emballage*).



Par la suite, les produits sont transférés en zone *d'emballage*, où ils sont emballés, à l'aide d'une machine, puis expédiés. Après leur sortie d'usine, les produits sont conservés à une température fixe, lors du transport, de la vente et chez le consommateur. La préparation du produit avant consommation n'est pas modélisée.

## 2) Phénomènes et paramètres associés à chaque étape du procédé

Dans ce paragraphe, nous décrivons le déroulement de chaque étape du procédé. Les phénomènes modélisés et paramètres associés à une étape sont en italique dans le texte et sont répertoriés dans le Tableau 24 et le Tableau 25 respectivement.

Deux types de phénomènes sont modélisés : ceux relatifs aux contaminations secondaires et ceux relatifs aux conditions physico-chimiques environnementales. En se basant sur les résultats du Chapitre II et sur la revue du Chapitre III, nous considérons deux phénomènes de contamination secondaire susceptibles de se produire: la recontamination et la contamination croisée. De la même manière, deux phénomènes relatifs aux conditions physico-chimiques environnementales sont pris en compte dans le cadre du modèle: la croissance des bactéries dans les produits et l'environnement et la réduction des populations microbiennes suite aux opérations d'hygiène.

**Tableau 24 Etapes du procédé de fabrication et phénomènes associés**

Phase	Etape	Impact des conditions physico-chimiques	Contaminations secondaires
Fabrication	Pré-emprésurage	Destruction partielle Stress environnementaux	Recontamination du lait pasteurisé
	Post-emprésurage		
	Moulage		
	Egouttage		
	Acidification		
	Refroidissement		
	Saumurage / salage		
	Ressuyage	Croissance	Recontamination de la surface des produits
	Séchage		
	Levuration		
Affinage	Soins	Croissance	Contamination croisée pendant les soins
	Maturation		Recontamination de la surface des produits
			Approvisionnement de l'environnement
	Préemballage		
Emballage	Emballage		Contamination croisée
Transport et conservation	Transport et Conservation	Croissance	

### *Fabrication*

Dix étapes sont considérées en phase de fabrication : pré-emprésurage, post-emprésurage, moulage, égouttage, acidification, refroidissement, saumurage ou salage à sec, ressuyage, séchage, levuration (Tableau 24). La durée de l'étape E, en heures, est notée  $d_e$ . En fonction de la technologie modélisée, certaines de ces étapes sont susceptibles de ne pas apparaître dans le procédé de fabrication, auquel cas la durée de l'étape est réduite à 0. Cela peut être le cas des étapes d'acidification, de refroidissement, de séchage, de levuration.

Chaque jour,  $L$  litres de lait sont réceptionnés. Le lait est réparti dans  $B$  bassines, contenant chacune un volume  $VB$  de lait (pré-emprésurage). Après emprésurage (post-emprésurage), le caillé est alors réparti dans des moules (moulage). On note  $LF$  le nombre de litres de lait nécessaires à la fabrication d'un seul fromage. Avant moulage, la contamination du contenu des bassines par l'environnement est possible. Dans ce cas, les microorganismes sont supposés se répartir de manière homogène et individuellement dans le caillé, impliquant, à terme, une contamination du cœur et de la surface des fromages. Les  $N$  moules sont disposés sur des claies régulièrement retournées pendant l'égouttage. Cette procédure favorise l'écoulement du sérum présent dans le caillé et, en cas de contamination d'une ou plusieurs unités de production, favorise la dispersion des bactéries parmi les unités de production (contamination croisée) et la contamination de l'environnement. Les étapes d'acidification ou de refroidissement sont caractérisées principalement par la température des hâloirs et le fait que la recontamination peut se produire à cette étape en cas de contamination du milieu. La croissance est peu probable du fait du pH très faible au cours de ces étapes. Au moment du saumurage, les fromages frais sont immergés dans une solution saline. Le salage à sec consiste, pour sa part, à les envelopper de sel sec. Au cours du saumurage, si des surfaces de produits sont contaminées, les bactéries sont susceptibles d'être transférées d'une surface de produit à l'autre par l'intermédiaire du bain de saumure (contamination croisée). De plus, la saumure peut naturellement être contaminée par *L. monocytogenes* dans laquelle elle est capable de survivre et par conséquent, contaminer les produits (*recontamination*). Dans les deux cas, les cellules contaminantes de cette étape subissent un stress osmotique. Après le saumurage, les fromages sont transférés dans des hâloirs où ils sont ressuyés. La contamination croisée est possible lors de cette étape puisque des opérateurs retournent chaque fromage successivement, ainsi qu'au cours de l'étape de séchage. La croissance des bactéries de *L. monocytogenes* est possible après l'étape de saumurage, car le pH remonte.

Les mesures d'hygiène en phase de fabrication sont soutenues : les circuits transportant la présure sont désinfectés plusieurs fois par jour, le matériel contenant le lait ou le caillé est nettoyé et désinfecté après chaque utilisation, les matériels divers (tranche caillé, pâle de brassage, filtre) sont renouvelés plusieurs fois par jour, le nettoyage et la désinfection de l'environnement est quotidien.

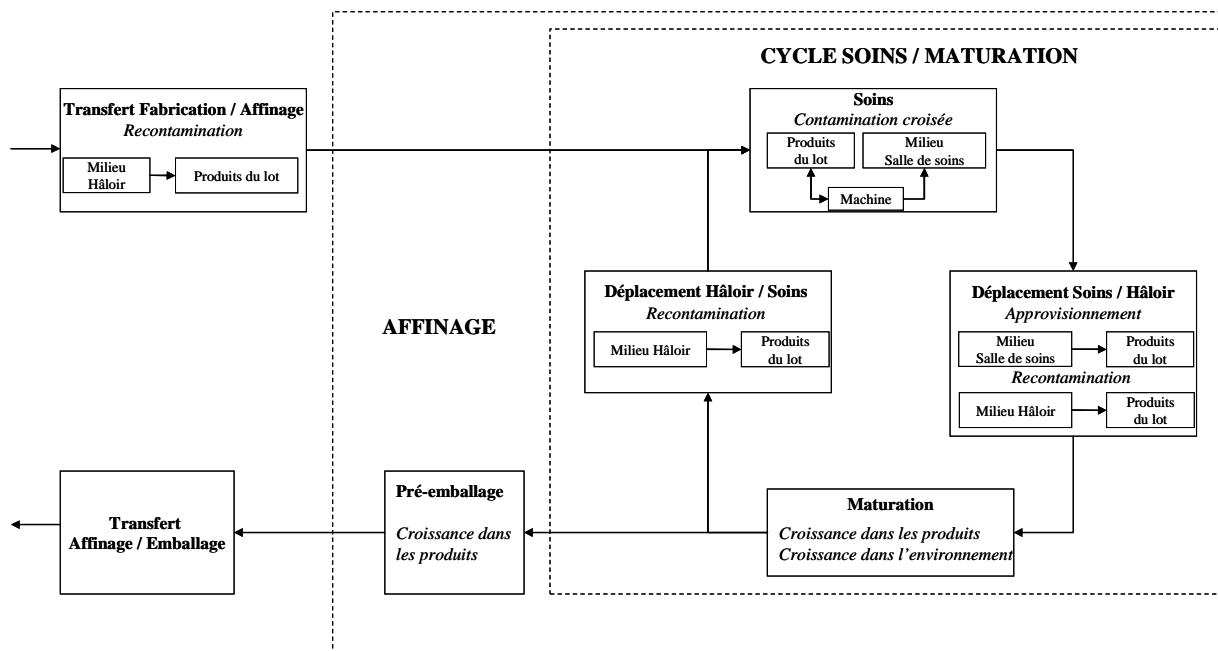
Du fait de l'intensité des mesures d'hygiène au cours de cette phase et des connaissances limitées concernant les contaminations secondaires à cette étape, les phénomènes intégrés au modèle pour la phase de fabrication sont

limités à la *recontamination* à chacune des étapes, selon un modèle simplifié, et à la *croissance* des cellules à partir du ressuyage. Les *stress* environnementaux et la *destruction partielle des cellules* engendrés par les conditions physico-chimiques au cours d'une étape, sont également pris en compte.

Les  $N$  produits issus des  $L$  litres sont répartis au terme de la phase de fabrication parmi  $Lo$  lots, dont le nombre de produits et le procédé de fabrication sont différents. Pour des raisons de simplification du modèle, nous avons considéré que ces lots sont tous constitués de  $P$  produits fabriqués selon le même procédé de fabrication et que ces lots se distinguent au début de la phase d'affinage. En sortie de la phase de fabrication, les  $P$  produits sont numérotés de 1 à  $P$ .

### Affinage

L'affinage est la phase la plus longue et la plus complexe de tout le procédé de fabrication du fait de la présence de multiples lots dans cette zone et de l'alternance entre étapes de soins et étape de maturation en hâloir (Figure 41). La phase d'affinage est caractérisée par un nombre  $CSH$  de cycle soins / maturation, durant lequel un ensemble de produits fait l'objet de soins, puis est transféré en hâloir d'affinage. Le temps de maturation  $THa$  et la température des produits pendant la maturation  $T^{\circ}_{Maturation}$  sont identiques d'un cycle à l'autre.

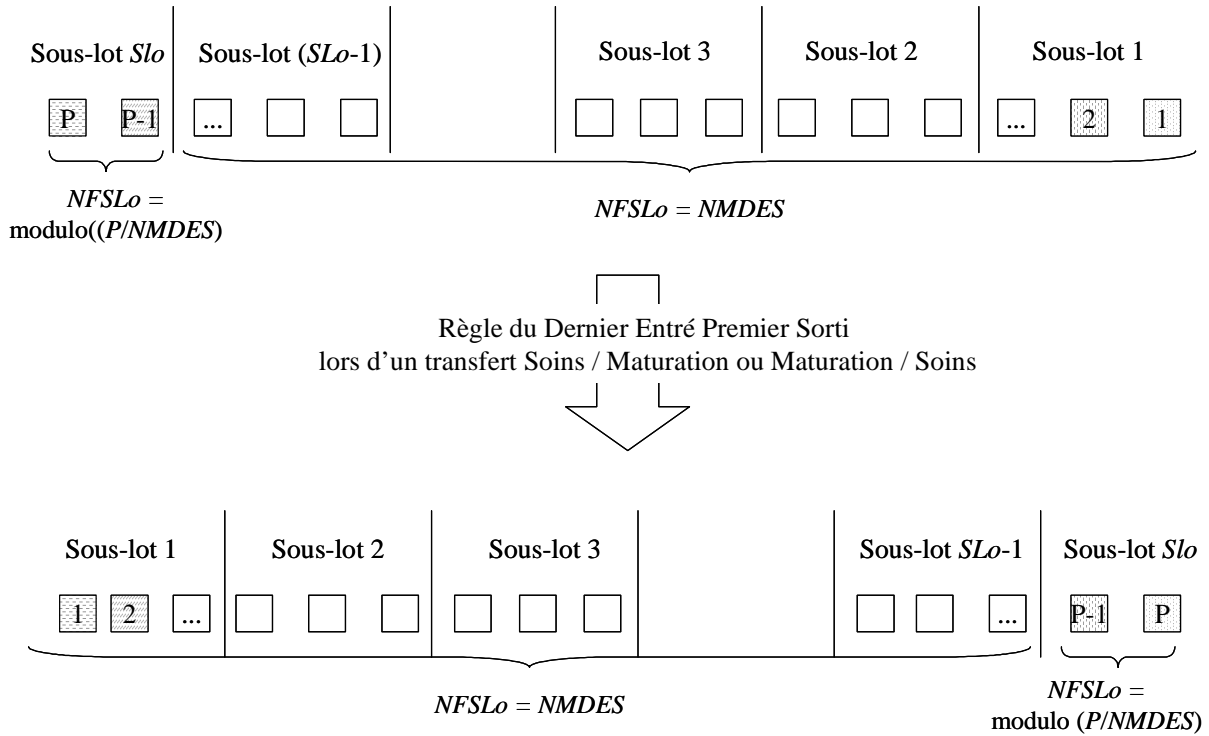


**Figure 41** Déroulement de la phase d'affinage. Après le transfert de la zone de fabrication vers la zone d'affinage, les produits subissent des soins puis une période de maturation, ce qui constitue un cycle. Après, un certain nombre de cycles soins/maturation, les produits sont transférés en zone de pré-emballage, puis emballés.

Les lots présents en zone d'affinage sont répartis dans un hâloir unique, correspondant en réalité au regroupement de *Ha* hâloirs. Le milieu de ce hâloir peut être contaminé. A l'intérieur du hâloir se trouve une salle contenant une unique machine de soins, dont le milieu et la machine peuvent être aussi être contaminés.

Le traitement des fromages dans la machine de soins peut être à l'origine du phénomène de *contamination croisée* si des produits sont contaminés en surface, telle que décrit dans le paragraphe I du Chapitre IV. Lors du transfert des produits depuis la salle de soins vers le hâloir, les déplacements des chariots par le personnel de l'environnement humide impliquent le transfert des colonies du milieu de la salle de soins vers celui du hâloir par les aérosols. Le milieu de la salle de soins joue donc un rôle d'approvisionneur de l'environnement du hâloir. L'*approvisionnement* survient au cours du transfert des produits de la salle de soins vers le hâloir, après leur traitement dans la machine de soins et avant les opérations d'hygiène dans la salle de soins.

Les opérations d'hygiène sur la machine de soins et dans le milieu de l'environnement de la salle de soins interviennent plusieurs fois par jour : entre chaque lot et au cours du traitement d'un lot (tous les *NDMES* produits). Ainsi, le passage d'un lot en salle de soins (entrée dans la salle, traitement, et retour) revient aux traitements successifs de *SLo-1* sous-lots ordonnés, composés de *NDMES* produits et d'un dernier lot composé des produits restants, ponctués par des mesures d'hygiène pour la machine et le milieu de la salle de soins. Les produits d'un sous-lot sont renumérotés de 1 à *NFSLo* après chaque transfert entre le hâloir et la salle de soins, suivant la règle du DEPS (Figure 42).



**Figure 42** Numérotation suivant la règle du DPES des produits d'un lot lors d'un transfert entre la salle de soins et le hâloir

Le milieu du hâloir héberge les colonies transférées depuis la salle de soins et les colonies déjà présentes, et permet leur *croissance* dans certaines conditions environnementales et en présence de nutriments. La présence de ces colonies dans le hâloir est à l'origine de la *recontamination* des produits présents dans le hâloir par divers vecteurs : les mains des opérateurs, les aérosols, etc. La *recontamination* est un phénomène continu pouvant survenir au cours d'une étape de maturation des produits dans le hâloir, mais ne survient que ponctuellement, dans le cadre du modèle pour des raisons de simplification : lorsqu'un sous-lot entre en salle de soins et lorsqu'il en sort, après l'*approvisionnement* du hâloir.

Dans le hâloir, les mesures d'hygiène sont moins fréquentes que dans la salle de soins. La fréquence  $NDHa$  de nettoyage et désinfection de l'environnement du hâloir s'exprime en jours.

La phase d'affinage se termine par le séjour des produits dans un hâloir de pré-emballage, caractérisé par le temps de séjour dans ce hâloir  $THa_{pré}$  et sa température ambiante  $T^{\circ}_{pré-emballages}$  et au cours duquel la *croissance* des microorganismes présents dans les produits est possible.

### *Emballage*

L'emballage des produits se déroule dans une salle au milieu sec, supposant que les bactéries ne sont pas capables de s'y développer dans l'environnement. Ainsi, seule la *contamination croisée* au cours de l'emballage par l'intermédiaire d'une machine est susceptible de se produire. La machine est nettoyée quotidiennement en fin de journée.

### *Transport et conservation*

Après avoir été emballés, les produits sont expédiés dans des camions réfrigérés vers les lieux de vente. La température au cours du transport et lors de la conservation est supposée constante ( $T_{T\&C}^{\circ}$ ), température à laquelle *L. monocytogenes* est capable de croître. Après expédition des produits, le modèle simule la *croissance* des cellules.

**Tableau 25 Paramètres et équations du modèle**

Phase ou phénomène	Paramètre	Définition	Description
Paramètres généraux	$Nb_J$	Entrée	Nombre de jours pendant lesquels on souhaite évaluer les conséquences de la primo-contamination
	$NbIter$	Entrée	Nombre d'itérations
Phase de fabrication	$d_E$	Entrée	Durée de l'étape E de la phase de fabrication (heures)
	$L$	Entrée	Nombre de litres de lait / jour
	$VB$	Entrée	Nombre de litres de lait / bassine
	$B$	$= L/VB$	Nombre bassines / jour
	$LF$	Entrée	Nombre de litres de lait / fromage
	$FB$	$= VB/LF$	Nombre de litres de fromage / bassine
	$N$	$= L/LF$	Nombre de fromages / jour
	$Lo$	Entrée	Nombre de lots / jour
	$P$	$= N/Lo$	Nombre de produits / lot
	$CSH$	Entrée	Nombre de cycles hâloir / soins
Phase d'affinage	$Tha$	Entrée	Durée d'une étape de maturation pendant un cycle hâloir / soins (heures)
	$Ha$	Entrée	Nombre de hâloirs en zone d'affinage
	$SLo$	$= P/NDMES + 1$	Nombre de sous-lots constituant un lot
	$NFSLo$	$\left\{ \begin{array}{l} = NDMES \text{ si le sous-lot est} \\ \text{parmi les } SLo-1 \text{ premiers} \\ \text{sous-lots du lot} \\ = \text{modulo } (P/NBMES) \text{ sinon} \end{array} \right.$	Nombre de fromages par sous-lot
	$THa_{pré}$	Entrée	Durée de l'étape de pré-emballage (maturation en hâloir) (en heures)
	$AgeCons$	Entrée	Age du produit en heures au moment de la consommation
	$NDHa$	Entrée	Fréquence de nettoyage/désinfection de l'environnement des hâloirs (en nombre de jours)
Opération d'hygiène	$NDMES$	Entrée	Fréquence de nettoyage/désinfection de la machine de soins et du milieu de la salle de soins (en nombre de produits)
	$eff_M$	Entrée	Efficacité d'une opération d'hygiène en nombre de réductions décimales pour l'élément M
	$RDSupp$	Entrée	Nombre de réductions décimales supplémentaires lors du passage au régime renforcé.

Paramètres physico-chimiques d'une étape	$T^{\circ}_E$	Entrée	Température au cours de l'étape E (constante tout au long de l'étape)
	$\Omega_t$	= f(t)	Valeur du paramètre physico-chimique $\Omega$ à l'instant t
	$\alpha_i$	Entrée	i <sup>ème</sup> paramètre du polynôme f de degré 4 modélisant l'évolution de $\Omega$ au cours du temps ; i = 1 à 4
Recontamination en phase de fabrication	$Recont_h$	Entrée	Indique s'il y a recontamination à l'étape $E_h$ ( $Recont_h=1$ si recontamination, 0 sinon)
	$I(E_h)$	Entrée	Ensemble d'indices des bassines contaminées (entre 1 et B) à l'étape $E_h$ , h=1 à 2
	$C(E_h)$	Entrée	Concentration des cellules contaminant les bassines (en cellules/litres) à l'étape $E_h$ , h=1 à 2
	$I'(E_h)$	Entrée	Ensemble d'indices des produits contaminés (entre 1 et P) à l'étape $E_h$ , h=4 à 10
	$C'(E_h)$	Entrée	Concentration des cellules contaminant un produit (en cellules/produit) à l'étape $E_h$ , h=4 à 10
	$Q(E_h)$	Entrée	Travail restant avant reprise de croissance des cellules recontaminantes à l'étape $E_h$ , h=1 à 10
	$I_J$	Entrée	Indice des jours pour lesquels le scénario de primo-contamination en phase de fabrication se produit
Primo-contamination en phase d'affinage	$NbCell_M$	Entrée	Nombre de cellules initialement présentes sur l'élément M de l'environnement d'affinage
Contamination croisée au cours des soins	$p_{fm}$	cf. Tableau 26	Proportion de colonies transférées de la surface du produit vers la machine
	$p_{mf}$		Proportion de colonies transférées de la machine vers la surface du produit
	$p_{me1}$		Proportions de colonies transférées depuis la machine vers le bac de récupération
	$p_{me2}$		Proportions de colonies transférées depuis la machine vers le milieu de la salle de soins
Approvisionnement	$p_{sh}$	Entrée	Probabilité de transfert d'une colonie de la salle de soins vers le hâloir
	$p_{crois}$	Entrée	Proportion de cellules en conditions de croissance dans le hâloir
Recontamination	$p_{détach}$	Entrée	Proportion de cellules détachée de la colonie et transférée
	$NCPR$	=H(0)/Ha	Nombre de colonies potentiellement recontaminantes
	$p_{cont}$	Entrée	Probabilité de contact entre une colonie et un produit lors du transfert d'un sous-lot
	$p_{reconta}$	=1-(1- $p_{cont}$ ) <sup>SLo</sup>	Proportion de colonies recontaminantes au passage du sous-lot de taille SLo
	$NCR$	=Bin( $NCPR$ , $p_{reconta}$ )	Nombre de colonies recontaminantes (ou de produits recontaminés)
Contamination croisée au cours de l'étape d'emballage	$p'_{fm}$	Entrée	Proportion de colonies transférées de la surface du produit vers la machine
	$p'_{mf}$	Entrée	Proportion de colonies transférées de la machine vers la surface du produit



Croissance environnement	$Tg$	Entrée	Temps de génération d'une cellule dans le milieu du hâloir
	$\mu_{env}$	$= \ln(2) / Tg$	Taux de croissance des cellules de l'environnement
Plan de contrôle	$TypePC$	$\left\{ \begin{array}{l} = 1 \text{ si les prélèvements sont} \\ \text{répartis sur les trois} \\ \text{premiers jours de la} \\ \text{semaine} \\ = 2 \text{ si les prélèvements sont} \\ \text{effectués au cours d'une} \\ \text{journée de la semaine,} \\ \text{choisie aléatoirement} \end{array} \right.$	Type de plan de contrôle
	$NbAnaE$	Entrée	Nombre de prélèvements par semaine dans le milieu de l'environnement en régime standard
	$AnaEnvSupp$	Entrée	Nombre d'analyses supplémentaires par semaine si au moins une analyse positive dans le milieu de l'environnement d'affinage
	$NbPrelS$	$\left\{ \begin{array}{l} = NbAnaE \\ = NbAnaE + n \times \\ AnaEnvSupp, \text{ où } n \text{ est le} \\ \text{nombre de semaines} \\ \text{écoulées depuis la première} \\ \text{détection} \end{array} \right.$	Nombre de prélèvements par semaine dans le milieu de l'environnement
	$NbPrelJ$	$\left\{ \begin{array}{l} = NbPrelS / 3 \text{ si } TypePC = \\ 1 \\ = NbPrelS \text{ si } TypePC = 2 \end{array} \right.$	Nombre de prélèvements par jour dans le milieu de l'environnement
	$Stot$	Entrée	Aire de la surface du milieu de l'environnement en $cm^2$
	$Sana$	Entrée	Aire de la surface prélevée en $cm^2$
	$P_{detect}$	$= 1 - e^{-NbPrelJ \times Sana \times C}$ , où C est la concentration en nombre de colonies par $cm^2$	Probabilité de détection d'une contamination du milieu de l'environnement un jour donné
	$Se$	Entrée	Sensibilité du test pour l'environnement
	$Sp$	Entrée	Spécificité du test pour l'environnement
	$Nbprod$	Entrée	Nombre de produits analysés dans un lot
	$de$	Entrée	Nombre d'analyses supplémentaires par sous-lot si au moins une analyse positive dans un produit

### 3) Paramètres physico-chimiques d'une étape

Les paramètres physico-chimiques considérés pour chaque étape du procédé sont la température ( $T^\circ$ ), l'activité de l'eau ( $a_w$ ) et le pH (pH). Les données ont été collectées en conditions réelles à partir du ressuyage, la chute brutale du pH suite à l'emprésurage empêchant toute croissance de *L. monocytogenes* avant cette étape.

Faute de données plus précises, la température est supposée constante au cours d'une étape et similaire pour le cœur et la surface du produit.

Pour le pH et l' $a_w$ , les données étaient disponibles pour la surface et le cœur des produits séparément, et en plus grand nombre. Le meilleur ajustement sur ces données était fourni par un polynôme de quatrième degré comportant un terme constant, comme suit :

Soit  $\Omega_t$ , la valeur du pH ou de l' $a_w$  en cœur ou en surface du produit à l'instant  $t$ .  $\Omega_t$  est défini par  $f(t) = \alpha_1 t^4 + \alpha_2 t^3 + \alpha_3 t^2 + \alpha_4 t + \alpha_5$  pour tout  $t > 0$ , où  $f$  est une fonction polynomiale de degré 4 qui modélise l'évolution du paramètre physico-chimique en fonction du temps (discrétisé en heures) depuis le début du ressuyage (c'est-à-dire depuis la fin du saumurage). Ainsi, à  $t = 0$ ,  $f(0)$  est la valeur du paramètre physico-chimique au début du ressuyage. A l'aide d'un simple changement d'échelle, la fonction  $f$  fournit donc la valeur du paramètre en fonction de l'âge du produit, en heures : si  $A_E$  est l'âge du produit en heures, à la sortie de l'étape  $E$ ,  $\Omega_{A_E} = f(A_E - A_{\text{saumurage}})$ .

## C. Modélisation dynamique d'un niveau de contamination

On cherche à évaluer les niveaux de contamination des différents éléments du modèle, qui varient sur des échelles de temps différentes. Une telle modélisation dynamique s'avère possible grâce à la structure proposée dans le Chapitre III pour les éléments solides, que nous explicitons dans le cadre du modèle. Nous proposons, également, dans ce paragraphe, une structure similaire adaptée aux éléments liquides.

### 1) Élément liquide

On considère le niveau de contamination d'une bassine de lait, caillé ou non, aux étapes précédant le moulage en phase de fabrication. On suppose que si des microorganismes sont présents dans le liquide, ils y sont répartis de manière homogène (du fait du brassage mécanique) et que les cellules ne forment pas des colonies. La structure de contamination proposée pour cet élément est la suivante :

Soit une étape E du procédé de fabrication et l'élément C (c'est-à-dire le contenu d'une bassine) à cette étape. Le niveau de contamination de l'élément C est défini à l'instant t à l'aide une matrice  $M_1(t)$  de taille  $N \times 2$  où N est le nombre d'états physiologiques différents des microorganismes présents dans l'élément C.

La  $i^{\text{ème}}$  ligne de la matrice  $M_1(t)$  caractérise le  $i^{\text{ème}}$  type de microorganismes de l'élément selon un couple de valeurs  $(C, Q) \in N \times [0; \infty[$  à l'instant t avec :

- C, la concentration de ce type de microorganismes, en nombre de cellules par litre,
- Q, la quantité de travail à accomplir avant l'entrée des cellules en phase exponentielle.

## **2) Élément solide**

La structure suivante s'applique à l'ensemble des éléments solides impliqués dans la dynamique de contamination, c'est-à-dire, pour l'environnement, une machine, un milieu ; pour les produits : la surface ou le cœur d'une unité de production.

Soit une étape E du procédé de fabrication et un élément C de cette étape.

Le niveau de contamination de l'élément C est défini à l'instant t à l'aide une matrice  $M_2(t)$  de taille  $N \times 2$ , N étant le nombre de colonies présentes dans l'élément.

La  $i^{\text{ème}}$  ligne de la matrice  $M_2(t)$  caractérise la  $i^{\text{ème}}$  colonie de l'élément selon un couple de valeurs  $(T, Q) \in N \times [0; \infty[$  à l'instant t avec :

- T, la taille de la colonie (nombre de cellules viables dans la colonie).
- Q, la quantité de travail à accomplir avant l'entrée des cellules en phase exponentielle.

## **3) Echelles de temps**

Différentes échelles de temps sont considérées en fonction des phénomènes modélisés :

- La première échelle de temps, appelée « Jour », a pour unité le jour et son origine est le jour de la primo-contamination.
- La deuxième échelle de temps, appelée « Procédé », s'applique à l'âge des produits, en heures, et a pour origine la pasteurisation. On notera AE, l'âge du produit en heures à la sortie de l'étape E.
- Une troisième échelle de temps, appelée « Produit » a pour unité le produit et pour origine le premier produit d'un ensemble de produit (lot ou sous-lot). Cette échelle de temps s'applique à certains phénomènes dont le niveau de contamination varie en fonction du traitement des produits.

- Enfin, une dernière échelle de temps, appelée « Heure » et dont l'origine est le début d'une étape et l'unité de temps, l'heure, permet de simuler la croissance des microorganismes et tout au long d'une étape du procédé, dont la durée, en heures, est connue.

L'évolution des niveaux de contamination se mesure en fonction de ces différentes échelles de temps et le niveau de contamination d'un élément est déterminé pour un âge donné selon l'échelle de temps sur laquelle il varie.

## D. Modélisation des phénomènes

Le niveau de détail des modèles associés à chaque phénomène dépend de l'impact présumé du phénomène, de la difficulté de modélisation et de la disponibilité des données. Chaque phénomène fait intervenir différents éléments dont on cherche à modéliser l'évolution du niveau de contamination de l'entrée de l'étape à sa sortie. Ces éléments peuvent être les suivants : un produit ou un ensemble de produits, le milieu et/ou la machine de l'environnement de l'étape. Pour un phénomène donné, le modèle associé fournit le niveau de contamination d'un élément en fonction de l'échelle de temps selon laquelle il varie.

Si une unité de production voit varier son niveau de contamination selon l'échelle Procédé, on notera :

- $B_j(E)$ , matrice de taille  $b_j(E) \times 2$ , le niveau de contamination de la  $j^{\text{ème}}$  bassine de la journée à la fin de l'étape E du procédé, pour une bassine,
- $C_i(E)$ , matrice de taille  $c_i(E) \times 2$ , le niveau de contamination du cœur du  $i^{\text{ème}}$  produit d'un ensemble de produits à la fin de l'étape E du procédé, pour un produit.
- $S_i(E)$ , matrice de taille  $s_i(E) \times 2$ , le niveau de contamination de la surface du  $i^{\text{ème}}$  produit d'un ensemble de produits à la fin de l'étape E du procédé, pour un produit.

Le niveau de contamination d'une composante E de l'environnement (milieu ou machine), pour un phénomène donné, est modélisé par une matrice  $E(t)$ , de taille  $e(t) \times 2$ , à un instant t de l'échelle de temps par rapport à laquelle il varie. Par exemple,  $E(i)$ , matrice de taille  $e(i) \times 2$  est le niveau de contamination d'une composante après le traitement du  $i^{\text{ème}}$  produit, si le niveau de contamination de cette composante varie selon l'échelle de temps Produit pour un phénomène donné.

Nous présentons dans ce paragraphe les modèles simulant l'évolution des niveaux de contamination des différents éléments d'un phénomène donné. Pour chaque phénomène, sont fournis en plus du schéma explicatif des éléments mis en jeu, les paramètres et échelles de temps associés.

## 1) Recontamination en phase de fabrication

En fabrication, le lait ou les fromages peuvent être contaminés par l'environnement. Les mécanismes inhérents à la contamination du produit pendant la fabrication étant peu connus, nous avons choisi de contaminer « manuellement » le lait ou les produits à chaque étape de la fabrication, selon un scénario préalablement choisi par l'utilisateur du modèle, qui définit lui-même les indices des unités de production contaminées (bassines et/ou produits) et leur niveau de contamination. La recontamination est susceptible de se produire à chaque sous-étape  $E_h$ ,  $h = 1$  à  $10$  (Figure 43), où  $E_h$  est la  $h^{\text{ème}}$  sous-étape de la phase de fabrication.

### a. Lait

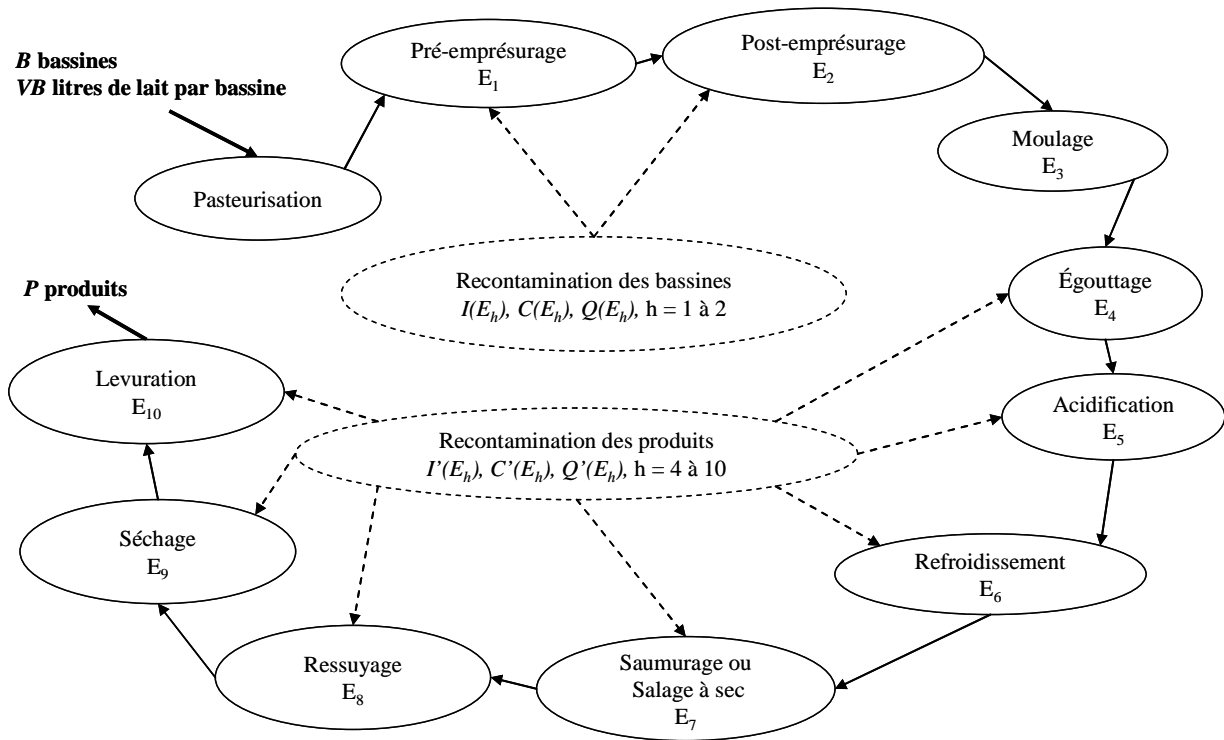
En phases de pré- et post- emprésurage, la recontamination du lait est possible bien que peu probable. En effet, de telles contaminations ne sont quasiment jamais détectées à ce stade du procédé pour des produits au lait pasteurisé. Les éléments impliqués dans le phénomène de recontamination à ces étapes sont les bassines contenant le lait pasteurisé. Ces bassines sont numérotées de  $1$  à  $B$  et contiennent chacune  $VB$  litres de lait.

Le niveau de contamination de la  $j^{\text{ème}}$  bassine,  $j \in [1 B]$ , est modélisé, à l'étape  $E_h$ ,  $h = 1$  à  $2$ , par la matrice  $B_j(E_h)$  de taille  $b_j(E_h) \times 2$ , où  $b_j(E_h)$  est le nombre de types de cellules en présence. On suppose qu'un seul type de cellules peut recontaminer les bassines au cours d'une étape ; dans ce cadre,  $b_j(E_1)$  peut être égal à  $1$  et  $b_j(E_1)$  peut être égal à  $1$  ou à  $2$ ,  $\forall j \in [1 B]$ .

$$\forall h = 1 \text{ à } 2, B_j(E_h) = \begin{pmatrix} f_h(B_j(E_{h-1})) \\ \begin{cases} \Phi & \text{si } j \notin I(E_h) \\ f_h(C(E_h) \ Q(E_h)) & \text{sinon} \end{cases} \end{pmatrix},$$

où  $I(E_h)$  est l'ensemble d'indices des bassines contaminées à l'étape  $E_h$ ,  $C(E_h)$  est la concentration à laquelle ces bassines sont contaminées, en cellules par litre,  $Q(E_h)$  est le travail à accomplir des cellules contaminantes avant reprise de croissance (Figure 43), et  $f_h$  est la fonction modélisant l'impact des conditions physico-chimiques de l'étape  $E_h$  sur la concentration (croissance ou destruction) ou sur le travail à accomplir (application d'un nouveau stress) des cellules en présence (cf. paragraphe I.D.9 de ce chapitre). De plus, si  $h = 1$ ,  $B_j(E_{h-1}) = \Phi$ .

Notons  $C_{hj}^r$  et  $Q_{hj}^r$  les composantes de la  $r^{\text{ème}}$  ligne ( $r = 1$  à  $b_j(E_h)$ ) de la matrice  $B_j(E_h)$ , caractérisant respectivement la concentration et le travail à accomplir avant reprise de croissance du  $r^{\text{ème}}$  type de cellules présentes dans la bassine  $j$  à l'étape  $E_h$ .



**Figure 43** Etapes et paramètres impliqués dans le phénomène de recontamination en phase de fabrication

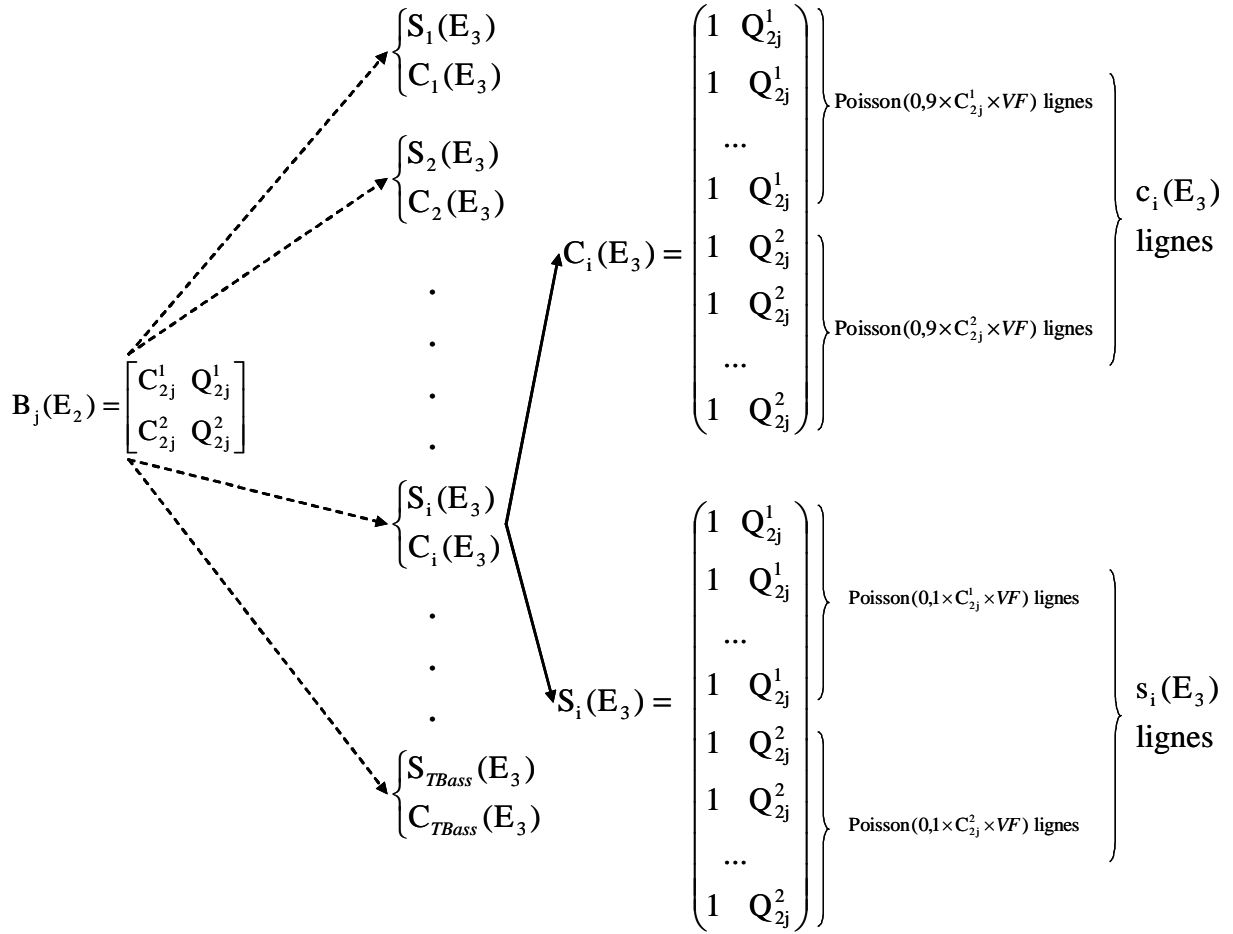
#### b. Moulage

Les cellules ayant contaminé le lait des bassines sont réparties de manière homogène et individuellement, du fait du brassage continu du caillé. Lors du moulage, on suppose que 90% de ces cellules sont transférées dans le cœur du produit et 10% sur sa surface (Sanaa et al., 2004). Le calcul du niveau de contamination des produits, en cœur et en surface, se fait selon une procédure combinant le moulage du caillé pour former des produits, et la répartition des cellules selon un processus aléatoire.

Pour chaque produit issu du moulage ( $E_3$ ), un nombre de cellules est attribué au cœur et à la surface, et ce pour chaque type de cellules présentes dans le lait.

A l'étape de post-emprésurage ( $E_2$ ), la recontamination de la  $j^{\text{ième}}$  bassine en pré- et/ou post-emprésurage implique que  $b_j(E_2) = 1$  ou  $2$ . Soit la  $r^{\text{ième}}$  ligne de la matrice  $B_j(E_2)$ . Pour tout  $i$  de  $1$  à  $T_{bass}$ , le nombre de cellules de ce type présentes dans le cœur du  $i^{\text{ième}}$  produit issu de cette bassine suit une loi de Poisson de paramètre  $0,9 \times C_{2j}^r \times LF$ . De la même manière, le nombre de cellules de ce type présentes en surface d'un produit issu de cette bassine suit une loi de Poisson de paramètre  $0,1 \times C_{2j}^r \times LF$ .

Dans ce cadre, la matrice  $C_i(E_3)$  représentant le niveau de contamination du cœur du  $i^{\text{ème}}$  produit après le moulage est de taille  $\sum_{r=1}^{b_j(E_h)} \text{Poisson}(0, 9 \times C_{2j}^r \times LF) \times 2$ . Les colonies résultantes sont de taille 1 car les cellules sont supposées isolées et de latence  $Q_{2j}^r$ . De la même manière, on construit la matrice  $S_i(E_3)$  de taille  $\sum_{r=1}^{b_j(E_h)} \text{Poisson}(0, 1 \times C_{2j}^r \times LF) \times 2$  représentant le niveau de contamination de la surface du  $i^{\text{ème}}$  produit (Figure 44).



**Figure 44** Exemple de répartition des cellules issues de la  $j^{\text{ème}}$  bassine parmi les produits lorsque  $b_j(E_2) = 2$

### c. Produits

De l'étape d'égouttage ( $E_4$ ) à l'étape de levuration ( $E_{10}$ ), la recontamination des produits par l'environnement est possible. A l'étape  $E_h$ ,  $h = 4$  à  $10$ , les éléments impliqués dans le phénomène de recontamination sont

les niveaux de contamination des surfaces  $S_i(E_h)$ ,  $i = 1$  à  $P$ , des  $P$  produits du lot. En effet, le cœur ne peut être recontaminé car inaccessible après le moulage.

Le niveau de contamination de la surface du  $i^{\text{ème}}$  produit est modélisé, à l'étape  $E_h$ ,  $h = 4$  à  $10$  par la matrice  $S_i(E_h)$  de taille  $s_i(E_h) \times 2$ ,  $i = 1$  à  $P$ .

$$\forall h = 4 \text{ à } 10, S_i(E_h) = \begin{pmatrix} g_h^1(S_i(E_{h-1})) \\ \Phi \\ \left\{ g_h^1 \left( \begin{pmatrix} 1 & Q'(E_h) \\ 1 & Q'(E_h) \\ \dots \\ 1 & Q'(E_h) \end{pmatrix} \right) \right\} C'(E_h) \text{ lignes} \end{pmatrix} \begin{matrix} \text{si } i \notin I'(E_h) \\ \text{sinon} \end{matrix}$$

où  $I'(E_h)$  est l'ensemble d'indices des produits contaminés à l'étape  $E_h$ ,  $C'(E_h)$  est la concentration à laquelle ces produits sont contaminés, en nombre de cellules par produit,  $Q'(E_h)$  est la quantité de travail des cellules contaminantes avant reprise de croissance, et  $g_h^1$  est la fonction modélisant l'impact des conditions physico-chimiques environnementales de l'étape  $E_h$  sur les cellules présentes sur la surface (cf. paragraphe I.D.9 de ce chapitre).

De la même manière, le cœur du produit, bien que ne subissant pas de recontamination après le moulage, peut voir ses colonies subir des transformations du fait des conditions physico-chimiques environnementales des étapes suivantes (cf. paragraphe I.D.9 de ce chapitre). On a alors :

$\forall h = 4 \text{ à } 10, C_i(E_h) = g_h^2(C_i(E_{h-1}))$ ,  $g_h^2$  étant la fonction modélisant l'impact des conditions physico-chimiques de l'étape  $E_h$  sur les cellules présentes dans le cœur du produit.

## 2) Contamination croisée au cours des soins mécaniques

Nous proposons un modèle de simulation de la contamination croisée au cours des soins basé sur le modèle du paragraphe I du Chapitre III. Nous rappelons dans un premier temps les caractéristiques principales du modèle initial, puis nous énumérons les spécificités du présent contexte. Enfin, nous proposons un modèle de contamination croisée au cours des soins adapté.

### a. Rappel du modèle initial

Soient  $f(i)_0$ , le nombre de cellules présentes à la surface du fromage  $i$  avant traitement dans la machine de soin et  $m(i)$ ,  $e(i)$ ,  $f(i)_1$  le nombre de cellules présentes dans l'environnement, sur la machine et sur le fromage  $i$  après son traitement, respectivement.



Ces valeurs sont calculées grâce au système d'équations aux différences (S) suivant (Équation 5), permettant de suivre l'évolution au cours du temps du nombre de cellules présentes dans chaque compartiment, selon l'échelle de temps « Produit ».

$$(S) \begin{cases} m(0) = e(0) = 0 \\ m(i) = (1 - p_{mc} - p_{me}) \times m(i-1) + p_{pm} \times f(i)_0, i \geq 1 \\ e(i) = e(i-1) + p_{me} \times m(i-1), i \geq 1 \\ f(i)_1 = (1 - p_{cm}) \times f(i)_0 + p_{mc} \times m(i-1), i \geq 1 \\ 0 < p_{cm}, p_{mc}, p_{me} < 1; p_{mc} + p_{me} < 1 \end{cases}$$

**Équation 5 Modèle de contamination croisée au cours des soins mécaniques**

Les paramètres de ce système représentent la proportion de biomasse transférée d'un compartiment à l'autre et s'appliquent aux cellules présentes dans la biomasse du produit. Ils s'apparentent ainsi à la probabilité de transfert d'une cellule. Ils ont été estimés à l'aide de données expérimentales collectées en conditions réelles et leur valeur s'exprime sous forme de distribution de probabilité empirique jointe dont les caractéristiques sont fournies dans le Chapitre IV.

Une approche stochastique a été adoptée pour simuler la contamination croisée, afin de tenir compte de l'aspect aléatoire lié à certains calculs : d'une part, la valeur des paramètres est tirée au sort dans la distribution de probabilité jointe, d'autre part, le calcul du nombre de cellules transférées d'un compartiment à l'autre suit une loi de distribution binomiale dont les paramètres sont le nombre de cellules dans le compartiment d'origine et la valeur du paramètre de transfert.

Simuler la contamination croisée nécessite de connaître le niveau de contamination initial des produits, l'environnement et la machine n'étant pas supposés contaminés initialement.

**b. Spécifications relatives au présent contexte**

Le niveau de contamination des compartiments de la présente étude est défini par le nombre de colonies présentes au sein d'un compartiment. Pour chaque colonie, sont fournis le nombre de cellules dans la colonie et leur quantité de travail restant avant reprise de croissance.

De même que dans le modèle de contamination croisée du chapitre IV, les colonies sont supposées dispersées au sein de la biomasse du produit et peuvent être transférées d'un compartiment à l'autre. La discussion du paragraphe I du Chapitre IV considèrerait le cas de colonies plutôt que de cellules et suggérerait d'appliquer un

facteur de cassage, tenant compte du fait qu'une colonie est susceptible de se scinder suite à l'action mécanique des brosses ou du frottement des produits sur les surfaces de la machine. Cependant, aucune étude ne permet d'estimer la valeur d'un tel paramètre et nous considérons donc pour le moment qu'une colonie est transférée dans son ensemble d'un compartiment à l'autre.

Les colonies d'un même produit ne sont pas toutes de taille égale et, outre le fait de calculer le nombre de colonies transférées d'un compartiment à l'autre, il s'agit également de déterminer quelles colonies sont transférées. Comme on suppose qu'elles ont toutes la même probabilité d'être transférées, les colonies transférées sont choisies aléatoirement.

En réalité, l'environnement de la machine se décompose en deux sous-compartiments :

- l'environnement situé à proximité des surfaces en contact de la machine (sol de la salle de soins, parois extérieures de la machine et personnel),
- le bac de récupération situé sous la machine.

Or, un unique paramètre de transfert de la machine vers l'environnement était considéré dans le modèle initial, dont nous avons pu estimer la distribution de probabilité. Dans le cadre du présent modèle, il est pourtant nécessaire de distinguer ces deux sous-compartiments. En effet, le premier, représentant en fait le milieu de la salle de soins, favorise l'approvisionnement du milieu de l'environnement d'affinage, du fait de déplacement des chariots de la salle de soins vers le hâloir d'affinage. Le deuxième implique l'élimination de colonies (car les résidus s'y trouvant sont directement transférés dans les égouts), c'est-à-dire, la sortie de colonies du système. De plus, il fait l'objet d'analyses microbiologiques.

L'estimation des paramètres de transfert de la machine vers ces deux sous-environnements peut être obtenue en comparant les résultats expérimentaux et les résultats des simulations du scénario de l'expérience. Les simulations du scénario de l'expérience fournissaient le niveau de population de BL2 de l'ensemble des deux sous-compartiments (moyenne des simulations : 10,71 log CFU) alors que les résultats expérimentaux donnaient le niveau de population de BL2 dans le sous-compartiment « bac de récupération » (résultat expérimental : 10,54 log CFU).

Le rapport de ces valeurs  $10^{10,54} / 10^{10,71} = 0,67$  fournit une approximation de la proportion de biomasse de l'environnement transférée vers le bac de récupération. Celle transférée vers le milieu de la salle de soins est alors  $1 - 0,67 = 0,33$ .

La contamination croisée correspond au cas où les produits sont initialement contaminés et sont susceptibles de contaminer d'autres produits, par contact direct ou non. Ce phénomène n'est pas « évitable ». Dans le

cadre du modèle, cela suppose que les niveaux de contamination de l'environnement et de la machine sont nuls avant le traitement du premier produit et qu'un ou plusieurs produits sont initialement contaminés. Si la machine est aussi initialement contaminée, on parle alors de recontamination couplée à la contamination croisée (cf. Chapitre III).

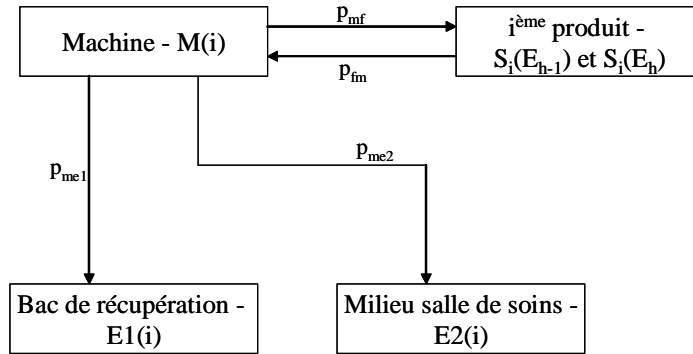
Dans le présent contexte, le niveau de contamination des produits en entrée du modèle sont conditionnés par leur passage dans l'étape précédente du procédé de fabrication, et ceux de la machine et de l'environnement, par les sorties relatives au traitement du lot précédent. Ainsi, les niveaux de contamination à cette étape peuvent être à l'origine des deux phénomènes : la recontamination et la contamination croisée. Dans le cadre de la recontamination, les probabilités de transfert des colonies initialement présentes sur la machine peuvent différer de celle provenant des produits du fait de l'adhérence possible des colonies aux surfaces. Cependant, le manque de connaissance et le souci de simplification du modèle nous ont conduits à utiliser les mêmes probabilités de transfert pour ces deux types de colonies. Le phénomène de recontamination par la machine est donc implicitement pris en compte.

### c. Modèle adapté

L'étape de soins des produits intervient plusieurs fois au cours de l'affinage, en fonction du nombre de cycles *CSH*. Le modèle et ses paramètres sont les mêmes quelque soit l'état d'avancement dans le procédé. Soit  $E$  l'étape de soins en cours d'un lot de produits. Les soins sont appliqués successivement à  $SLo$  sous-lots contenant  $NFSLo$  produits chacun (cf. paragraphe I.B.2 de ce chapitre); entre chaque sous-lot, l'environnement de la salle de soins (milieu et machine) subit une opération d'hygiène. Dans ce cadre, le modèle de contamination croisée adapté implique de considérer les éléments suivants :

- un sous-lot de produits contenant  $NFSLo$  produits, numérotés de 1 à  $NFSLo$ , le premier produit soigné étant numéroté 1. Le niveau de contamination de la surface du  $i^{ème}$  produit est modélisé, avant l'étape de soins, par la matrice  $S_i(E_{h-1})$  de taille  $s_i(E_{h-1}) \times 2$ ,  $\forall i = 1$  à  $NFSLo$ . En effet, les modifications induites par la contamination croisée au cours des soins ne concernent que la surface du produit,
- une machine dont le niveau de contamination est modélisé, après le traitement du  $i^{ème}$  produit, par la matrice  $M(i)$  de taille  $m(i) \times 2$ ,
- le milieu représentant le bac de récupération sous la machine, dont le niveau de contamination est modélisé, après le traitement du  $i^{ème}$  produit par la matrice  $E1(i)$  de taille  $e1(i) \times 2$ ,
- le milieu représentant l'environnement proche de la machine, dont le niveau de contamination est modélisé, après le traitement du  $i^{ème}$  produit par la matrice  $E2(i)$  de taille  $e2(i) \times 2$ .

Les conditions initiales pour l'application du modèle sont données par les matrices  $M$ ,  $E1$  et  $E2$  avant l'arrivée du sous-lot en salle de soins, que l'on note  $M(0)$ ,  $E1(0)$  et  $E2(0)$ , où 0 représente l'origine de l'échelle de temps « Produit » et par les matrices,  $S_i(E_{h-1})$ ,  $\forall i = 1 \text{ à } NFSLo$ .



**Figure 45 Modèle de contamination croisée adapté**

Lors du traitement du  $i^{\text{ème}}$  produit, un transfert de colonies s'opère entre les différents compartiments du modèle (Figure 45).  $p_{pm}$  et  $p_{mp}$  sont respectivement la proportion de colonies transférées de la machine vers la surface du produit et inversement.  $p_{me1}$  et  $p_{me2}$  sont les proportions de colonies transférées depuis la machine vers le bac de récupération et vers le milieu de la salle de soins respectivement.

Le calcul du nombre de colonies transférées dans un compartiment est suivi du choix des colonies transférées, qui se fait par tirage aléatoire des lignes dans la matrice du compartiment d'origine. Chaque ligne a deux composantes : la taille et la quantité de travail des cellules de la colonie, dont les valeurs sont invariantes lors de l'étape des soins (sous l'hypothèse de non croissance, de conditions environnementales non stressantes et de non éclatement des colonies). Les lignes sélectionnées sont concaténées à la matrice décrivant le niveau de contamination du compartiment d'arrivée. Ainsi, le nombre de lignes des matrices de chaque compartiment varie au fur et à mesure du traitement des produits. Le système d'équations aux différences (S') décrit le nombre de colonies présentes dans chaque compartiment après le soin du fromage de rang  $i$ .

$$(S') \begin{cases} m(i) = (1 - p_{mp} - p_{me1} - p_{me2}) \times m(i-1) + p_{pm} \times s_i(E_{h-1}), i \geq 1 \\ e1(i) = e1(i-1) + p_{me1} \times m(i-1), i \geq 1 \\ e2(i) = e2(i-1) + p_{me2} \times m(i-1), i \geq 1 \\ s_i(E_h) = (1 - p_{pm}) \times s_i(E_{h-1}) + p_{mp} \times m(i-1), i \geq 1 \\ 0 < p_{pm}, p_{mp}, p_{me1}, p_{me2} < 1; p_{mp} + p_{me1} + p_{me2} < 1 \end{cases}$$

Les valeurs des paramètres  $p_{mp}$  et  $p_{pm}$  du modèle adapté sont identiques à celles des paramètres correspondants du modèle initial, respectivement,  $p_{mc}$  et  $p_{cm}$ . Les valeurs des paramètres  $p_{me1}$  et  $p_{me2}$  sont,

elles, obtenues via de la valeur du paramètre  $p_{me}$  du modèle initial :  $p_{me1}$  et  $p_{me2}$  sont respectivement égaux à  $0,33p_{me}$  et  $0,67p_{me}$  (Tableau 26).

**Tableau 26 Valeurs des paramètres des modèles de contamination croisée au cours des soins mécaniques, initial et adapté**

Paramètres du modèle initial	Percentiles des distributions de probabilité empiriques des paramètres du modèle initial					Paramètres du modèle adapté
	2,50%	25%	50%	75%	97,50%	
$p_{cm}$	0,96	0,98	0,98	0,99	0,99	$p_{pm} = p_{cm}$
$p_{mc}$	0	0,03	0,06	0,1	0,16	$p_{mp} = p_{mc}$
$p_{me}$	0,01	0,02	0,04	0,06	0,12	$p_{me1} = 0,33p_{me}$ $p_{me2} = 0,67p_{me}$

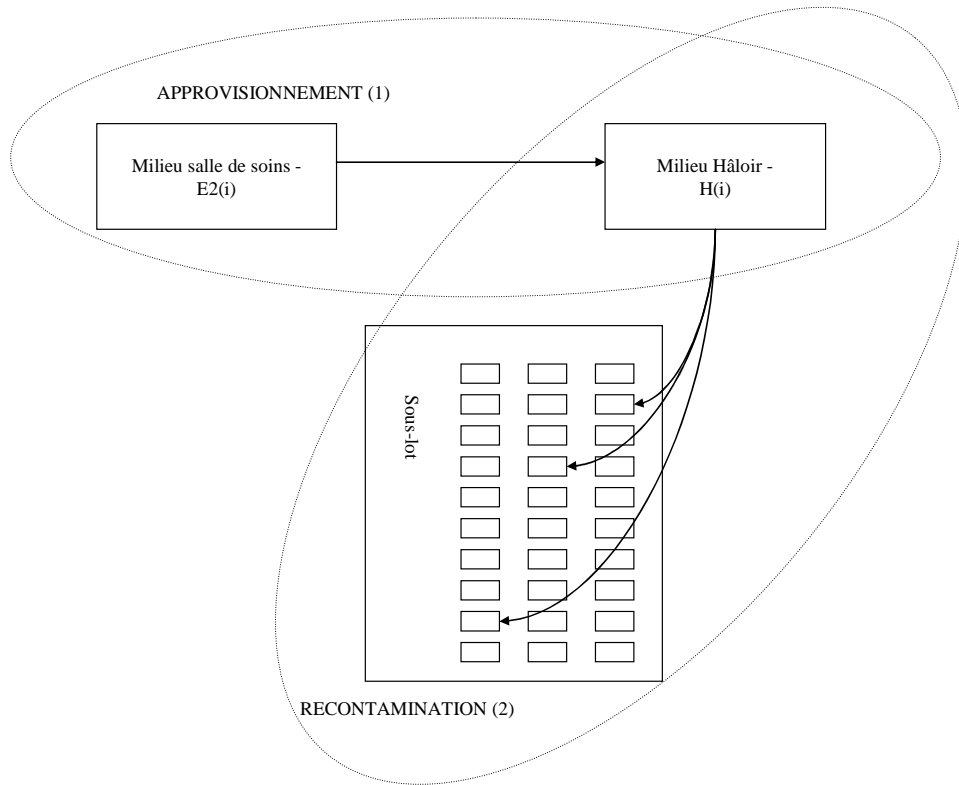
d. Devenir des colonies de l'environnement après l'étape de soins

Pendant le traitement des produits, les colonies du compartiment E1 (bac de récupération) disparaissent suite à leur évacuation systématique dans les égouts et suite à la désinfection du bac de récupération (supposée parfaite). Les colonies de la machine (compartiment M) sont partiellement détruites lors du nettoyage et la désinfection de la machine en circuit fermé (cf. paragraphe I.D.7 de ce chapitre). Après l'opération d'hygiène, les colonies survivantes du compartiment « Machine » deviennent potentiellement recontaminantes pour le lot suivant (cf. paragraphe I.D.6 de ce chapitre).

Une partie des colonies du compartiment E2 (milieu de la salle de soins) est transférée dans le milieu de l'environnement de la salle d'affinage lors du retour du sous-lot en hâloir d'affinage. Les colonies transférées dans le milieu du hâloir s'ajoutent à celle déjà présentes (cf. paragraphe I.D.3 de ce chapitre) et une certaine proportion de ces colonies contamine alors les produits du sous-lot (cf. paragraphe I.D.4 de ce chapitre). Les colonies non transférées de la salle de soins vers le hâloir sont partiellement détruites lors de l'opération d'hygiène de la salle de soins (cf. paragraphe I.D.7 de ce chapitre).

### 3) Approvisionnement

Les éléments impliqués dans le phénomène d'approvisionnement sont le milieu de la salle de soins et le milieu du hâloir. Au cours de ce phénomène, les niveaux de contamination de ces deux milieux varient selon l'échelle de temps « Produit » puisqu'ils sont évalués suite au transfert de la totalité du sous-lot (après le passage du dernier produit du sous-lot, de rang *NFSLo*), et en fonction de leurs niveaux de contamination précédant le transfert de ce sous-lot (avant le passage du premier produit de rang 1).



**Figure 46 Approvisionnement et recontamination lors du transfert d'un sous-lot de la salle de soins vers la salle d'affinage.**

Les matrices associées à chaque élément sont les suivantes :

- Le niveau de contamination du milieu de la salle de soin est modélisé par la matrice  $E2(i)$  de taille  $e2(i) \times 2$  après le transfert du  $i^{\text{ème}}$  produit du sous-lot en salle de soins.
- Le niveau de contamination du milieu du hâloir est modélisé par la matrice  $H(i)$  de taille  $h(i) \times 2$  après le transfert du  $i^{\text{ème}}$  produit du sous-lot en salle de soins.

Soient  $E2(0)$  et  $H(0)$  de tailles respectives  $e2(0) \times 2$  et  $h(0) \times 2$ , les niveaux de contamination des milieux du hâloir et de la salle de soins respectivement, avant le transfert du sous lot, où 0 est l'origine de l'échelle de temps « Produit ». Ces valeurs correspondent aux conditions initiales du modèle d'approvisionnement.

Une probabilité  $p_{sh}$  de transfert de la salle de soins vers le milieu du hâloir s'applique à chaque colonie présente dans le milieu de la salle de soins après le traitement des produits dans la machine de soins. La valeur de ce paramètre dépend de la propension d'une usine à cloisonner ses salles afin de réduire la

dissémination. Une faible valeur implique une faible contamination du milieu du hâloir d’affinage et inversement.

Les colonies provenant de la machine de soins et la durée entre la contamination du milieu de la salle de soins et le transfert du lot n’étant pas assez grande pour permettre l’adhésion des bactéries aux surfaces, elles sont transférées dans leur ensemble depuis la salle de soins vers le hâloir d’affinage.

Le nombre de colonies  $N_{tr}$  transférées du milieu de la salle de soins vers celui du hâloir suit une loi binomiale de paramètres  $e2(0)$  et  $p_{sh}$ . Les  $N_{tr}$  colonies transférées sont tirées au sort dans les lignes de la matrice  $E2(0)$  et concaténées à la matrice  $H(0)$ . Les matrices résultantes sont les matrices  $E2(NFSLo)$  de taille  $e2(NFSLo) \times 2$ , et  $H(NFSLo)$  de taille  $h(NFSLo) \times 2$ , avec :

$$e2(NFSLo) = e2_0 - \text{Binomiale}(e2(0), p_{sh})$$

$$h(NFSLo) = h_0 - \text{Binomiale}(e2(0), p_{sh})$$

On notera que les résultats sont indépendants du nombre de produits constituant le sous-lot et de leur niveau de contamination.

Parmi les colonies transférées dans le milieu du hâloir, une proportion  $p_{crois}$  est capable de croître dans le hâloir. Ce paramètre dépend de l’état hygiénique du hâloir et de la présence de nutriments sur le sol. Le nombre de colonies susceptibles de croître dans le hâloir suit une loi binomiale de paramètres  $N_{tr}$  et  $p_{crois}$ . La simulation de la croissance est explicitée au paragraphe I.D.8 de ce chapitre.

Les autres colonies sont présentes dans le hâloir sans possibilité de croître. Elles subissent un stress nutritionnel caractérisé par une modification de la quantité de travail à accomplir avant reprise de croissance, alors égale à  $Q_{nutri}$ . De plus la taille de chaque colonie subit  $RD_{nutri}$  réductions décimales (cf. paragraphe I.D.9 de ce chapitre). Après 15 jours de présence dans le hâloir, ce type de colonies disparaît.

#### 4) Recontamination en phase d’affinage

Les éléments impliqués dans ce phénomène sont le milieu du hâloir et les surfaces des produits du sous-lot en cours de transfert (Figure 46). Le niveau de contamination du milieu du hâloir varie sur l’échelle de temps « Produit » puisqu’on l’évalue après le transfert d’un sous-lot de taille  $NFSLo$ . Les niveaux de contamination des surfaces des produits varient sur l’échelle de temps « Procédé ». Deux cas de figures se présentent : le sous-lot entre en salle de soins ou le sous-lot sort de la salle de soins. Les matrices associées à chaque élément sont les suivantes :

- Le niveau de contamination des surfaces d’un produit du rang  $i$  du sous-lot est modélisé par la matrice  $S_i(E_h)$  de taille  $s_i(E_h) \times 2$ , où  $E_h$  représente une étape du procédé. Si les produits *entrent* en

salle de soins,  $E_h$  est une étape de maturation en hâloir ; sinon,  $E_h$  est une étape de soins. Dans les deux cas, on cherche à évaluer  $S_i(E_{h+1})$ , correspondant au niveau de contamination après le transfert du sous-lot.

- Le niveau de contamination du milieu du hâloir est modélisé par la matrice  $H(i)$  de taille  $h(i) \times 2$  après le transfert du  $i^{\text{  me}}$  produit du sous-lot en salle de soins.

Soient  $H(0)$  de taille  $h(0) \times 2$ , le niveau de contamination initial du milieu du hâloir avant le transfert du sous-lot. Dans le cas d'un sous-lot sortant de la salle de soins,  $H(0)$  correspond au niveau de contamination du milieu du hâloir après approvisionnement.

De même que pour le phénomène d'approvisionnement, une colonie présente dans le milieu du hâloir a une certaine probabilité d'être transférée vers le produit d'un sous-lot en cours de déplacement. Cependant, une différence réside entre ces deux types de transfert. En effet, les colonies considérées peuvent être présentes dans le milieu du hâloir d'affinage depuis un temps plus ou moins long en fonction de leur historique. Or, une faible période est nécessaire pour l'adhésion des cellules de *L. monocytogenes*    des surfaces inertes (cf. Chapitre III). On considère ainsi que les colonies présentes dans l'environnement du hâloir sont partiellement adhérentes aux surfaces et qu'en cas de recontamination seule une proportion  $p_{\text{détach}}$  de la colonie est détachée de la surface et transférée vers le produit.

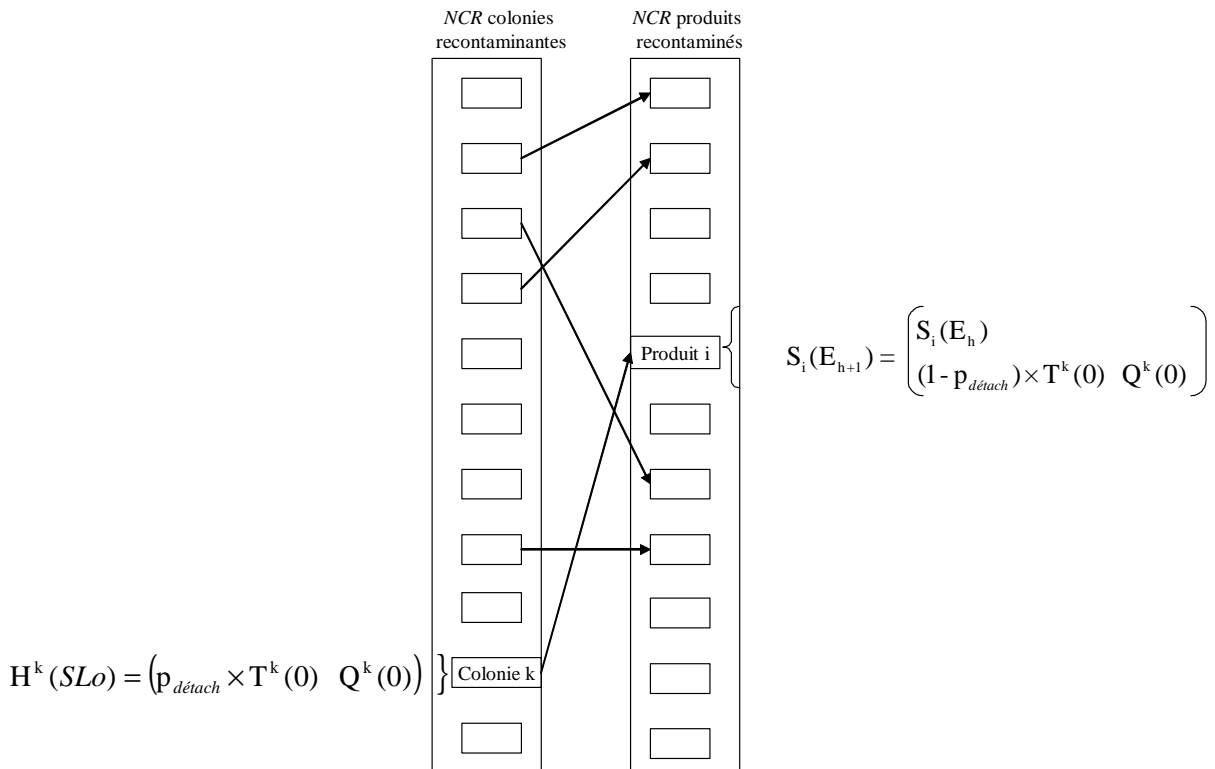
La zone d'affinage est modélisée par un unique hâloir représentant l'ensemble des hâloirs de l'usine considérée, au nombre de  $Ha$ . Or, en réalité, un lot est entreposé dans une partie seulement de l'unique hâloir et par conséquent, seule une proportion  $1/Ha$  des colonies du hâloir est potentiellement recontaminante. Le nombre de colonies potentiellement recontaminantes  $NCPR$  est donc donné par  $h(0)/Ha$ .

Dans ce cadre, soit  $p_{\text{cont}}$  la probabilité de contact entre une colonie et un produit appartenant au sous-lot de taille  $NFSLo$ . Le nombre de colonies recontaminantes dépend du nombre de produits du sous-lot : la probabilité qu'une colonie ne contamine aucun produit est  $(1 - p_{\text{cont}})^{NFSLo}$ . La probabilité qu'elle contamine au moins un produit est donc  $1 - (1 - p_{\text{cont}})^{NFSLo}$ . Or il est supposé qu'une colonie ne peut contaminer qu'un seul produit à la fois si elle est recontaminante. Ainsi,  $p_{\text{reconta}} = 1 - (1 - p_{\text{cont}})^{NFSLo}$  est aussi la proportion de colonies recontaminantes au passage du sous-lot de taille  $NFSLo$ . Une colonie augmente donc ces chances de recontamination avec le nombre de produits. On en déduit le nombre de colonies recontaminantes  $NCR$  (et ainsi le nombre de produits recontaminés), modélisé par une loi binomiale de paramètre  $NCPR$  et  $p_{\text{reconta}}$ .



Les indices des *NCR* colonies recontaminantes sont tirés au sort aléatoirement dans les lignes de la matrice  $H(0)$ . Soit  $K$  l'ensemble constitué de ces indices. Soit  $H^k(0)$  et  $H^k(NFSLo)$  le vecteur de taille  $2 \times 1$  correspondant à la colonie recontaminante du milieu du hâloir de rang  $k$  avant et après recontamination. Les composantes de ces vecteurs sont respectivement  $(T^k(0) \ Q^k(0))$  et  $(T^k(NFSLo) \ Q^k(NFSLo))$ , correspondant à la taille et la quantité de travail restant avant reprise de croissance. Les colonies étant partiellement détachées au cours de la recontamination,  $T^k(NFSLo) = p_{détach} \times T^k(0)$  pour tout  $k \in K$ .  $Q^k(NFSLo)$  reste inchangé, égal à  $Q^k(0)$ .

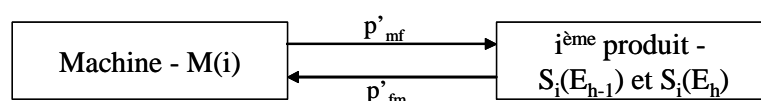
De même, les indices des produits contaminés sont tirés au sort parmi les rangs des produits (entre 1 et *NFSLo*). Soit  $I$  l'ensemble des indices des produits recontaminés. Les colonies recontaminantes sont réparties aléatoirement parmi les produits recontaminés. Soit  $k$  la colonie de rang  $k \in K$  recontaminant le produit de rang  $i \in I$  ; alors la matrice  $S_i(E_{h+1})$  du produit recontaminé est de taille  $(s_i(E_h)+1) \times 2$  et la colonie supplémentaire a pour taille  $((1 - p_{détach}) \times T^k(0)) \times 2$ . Le temps de travail restant avant reprise de croissance de cette dernière est égal à  $Q^k(0)$ .



**Figure 47 Recontamination en phase d'affinage**

## 5) Contamination croisée au cours de l'emballage

La contamination croisée au cours de l'emballage est induite par la machine d'emballage. Nous avons choisi d'appliquer le même modèle que celui de la contamination croisée au cours de soins mécaniques. Cependant, il n'existe pas de compartiment représentant l'environnement : l'échange de biomasse se produit uniquement entre les surfaces de la machine et les produits en cours d'emballage (Figure 48). Ainsi, les paramètres de transfert vers le bac de récupération et le milieu de la salle d'affinage sont nuls dans ce modèle. Les valeurs des autres paramètres n'ont pas été évaluées expérimentalement et sont choisies par l'utilisateur du modèle de simulation.



**Figure 48** Modèle de contamination croisée au cours de l'étape d'emballage

De même que pour le modèle de contamination croisée au cours des soins, les conditions initiales d'application du modèle sont fournies par les sorties des étapes précédentes pour les produits et par les sorties relatives au traitement du lot précédent pour la machine d'emballage.

Le phénomène de recontamination est possible si des colonies sont initialement présentes sur la machine au début du traitement du lot, auquel cas les paramètres de transfert peuvent être différents du fait de l'adhérence possible de cellules à la machine d'emballage, phénomène observé dans la réalité industrielle (cf. Chapitre II). Cependant, en raison du manque de connaissance sur le mécanisme d'adhérence et de transfert au cours de cette étape, nous avons considéré que les colonies présentes sur la machine à l'arrivée d'un ensemble de produits sont détachées dans leur ensemble. Ainsi, de la même manière que pour les soins, le phénomène de recontamination par la machine d'emballage est implicitement pris en compte.

## 6) Réduction de la population microbienne par les mesures d'hygiène

Les opérations d'hygiène dans l'environnement ont lieu à une fréquence connue, s'exprimant en nombre de jours ou de produits. Leur efficacité est donnée en nombre de réductions décimales, paramètre initialement déterminé par l'utilisateur du modèle, mais qui peut être modifié en fonction des résultats issus des auto-contrôles (cf. paragraphe I.D.10 de ce chapitre). Le modèle simulant la réduction microbienne suite à une opération d'hygiène est identique quelque soit l'élément considéré (machine ou milieu), la fréquence de l'opération et son efficacité.

Soit un élément M de l'environnement subissant une opération d'hygiène. Son niveau de contamination est donné à l'instant t par la matrice M(t) de taille  $m(t) \times 2$ . Pour tout k de 1 à m(t),  $T^k(t)$  représente la taille de la k<sup>ième</sup> colonie et  $Q^k(t)$ , la quantité de travail avant reprise de croissance.

Supposons qu'à l'instant  $t_{\text{hyg}}$  ait lieu une opération d'hygiène. Alors, pour tout k de 1 à m(t),  $T^k(t_{\text{hyg}} + 1) = T^k(t_{\text{hyg}}) \times 10^{-\text{eff}_M}$ , où  $\text{eff}_M$  est l'efficacité de l'opération d'hygiène pour l'élément M, en nombre de réductions décimales de la population microbienne.

Les cellules survivantes à l'opération d'hygiène voit leur quantité de travail avant reprise de croissance modifié de tel sorte que :  $Q^k(t_{\text{hyg}} + 1) = Q_{\text{hyg}}$  (cf. paragraphe I.D.9 de ce chapitre).

## 7) Croissance des microorganismes

La croissance des microorganismes se décompose en deux phases distinctes : le déroulement de la phase de latence et la multiplication des cellules, et pour deux types de matrices : les produits et l'environnement.

La phase de latence correspond à une phase de régénération des cellules suite à un stress, de même que la multiplication des cellules.

La croissance intervient au niveau des produits en cours de production et dans l'environnement.

Pour les produits, la croissance des cellules est simulé avec le modèle de microbiologie prévisionnelle décrit dans le chapitre III, dont les paramètres ont été estimés pour *L. monocytogenes* dans les produits laitiers et fromagers notamment (Augustin et al., 2005; Rosso et al., 1996). Ce modèle tient compte des paramètres physico-chimiques suivants : le pH, l'activité de l'eau, la température et leur interaction. La simulation du déroulement de la phase de latence se base sur les résultats de (Guillier, 2005), également décrite au chapitre III.

La croissance dans l'environnement du hâloir d'affinage est modélisée selon un modèle de croissance simplifié tenant compte du temps de génération des cellules (temps mis pour une bactérie pour se dupliquer). Ce modèle s'applique aux colonies présentes dans le hâloir d'affinage, capables de se multiplier du fait de la présence de nutriments (cf. paragraphe I.D.3 de ce chapitre), les machines étant supposées ne pas présenter des conditions favorables à la croissance de *L. monocytogenes*. Une grande incertitude réside sur la valeur de ce temps de génération dans l'environnement : il dépend des conditions environnementales physico-chimiques, de la disponibilité de nutriments (qualitativement et quantitativement), de l'état physiologique des cellules de la colonie.

a. Unité de production

Considérons des cellules placées dans des conditions environnementales favorisant leur croissance. Deux cas se présentent : les cellules sont en milieu liquide ou en milieu solide. En milieu liquide, les étapes concernées sont le pré- et le post-emprésurage. Or, entre la pasteurisation et l'emprésurage, moins de deux heures s'écoulent et, après emprésurage, une chute brutale du pH s'ensuit, empêchant la croissance des cellules. De plus, entre le moulage et l'égouttage, les valeurs de pH sont trop faibles pour favoriser la croissance de *L. monocytogenes* avec des taux de croissance significatifs. Pour ces raisons, nous avons choisi de simuler la croissance des cellules à partir du ressuyage. Croissance dans le cœur et croissance en surface du produit sont simulés selon le même modèle ; seuls les paramètres physico-chimiques diffèrent.

Supposons qu'un produit entre dans une étape du procédé favorisant la croissance ; les étapes possibles sont les suivantes :

- ressuyage, séchage, levuration, en fabrication,
- maturation et pré-emballage, en affinage,
- Transport et conservation, après l'expédition.

Soit l'étape E du procédé au cours de laquelle la croissance dans une unité de production est possible. Cette étape est caractérisée par une durée  $d_E$ , sur l'échelle de temps « Heure ».

Soit l'unité de production de rang i appartenant à un lot entrant dans l'étape E. Sur l'échelle de temps « Heure », elle est caractérisée par les matrices  $C_i(t)$  et  $S_i(t)$ , représentant respectivement les niveaux de contamination du cœur et de la surface. Chaque ligne de ces matrices est un vecteur représentant la taille et le temps de latence d'une colonie :  $(T(t) \ Q(t))$ , pour tout  $t \in [0, d_E]$ .

Nous cherchons à estimer les valeurs  $T(d_E)$  et  $Q(d_E)$ , sorties de l'étape E, sachant  $T(0)$  et  $Q(0)$ , sorties de l'étape précédente. Chaque colonie se multiplie indépendamment selon le modèle de croissance primaire logistique avec délai, décrit dans l'Équation 2 du chapitre III. Dans ce modèle, la phase exponentielle débute à l'instant t tel que  $Q(t) = 0$  et l'inoculum correspond au nombre initial de cellules dans la colonie  $T(0)$ .  $X_{\max}$  est fourni par l'utilisateur, et n'excède a priori par  $10^5$  (cf. Chapitre III).  $\mu(t)$  dépend des conditions environnementales  $T^\circ(t)$ ,  $pH(t)$  et  $a_w(t)$ , à l'instant t, et est modélisé par le modèle secondaire de croissance décrit dans l'Équation 3 du chapitre III.

On a alors :

$$\text{pour tout } t \in [0, d_E] \left\{ \begin{array}{ll} \frac{dT}{dt}(t) = 0 & \text{pour } t / Q(t) > 0 \\ \frac{dT}{dt}(t) = \mu(t) \cdot T(t) \cdot \left(1 - \frac{T(t)}{X_{\max}}\right) & \text{pour } t / Q(t) = 0 \\ T(t) = T(0) & \text{pour } t = 0 \end{array} \right.$$

**Équation 6 Modèle secondaire de croissance adapté**

*Recherche des conditions environnementales favorables*

A chaque instant  $t$  de l'étape E sont donnés les paramètres physico-chimiques de l'unité de production:

- la température, supposée constante et commune au cœur et à la surface,
- le pH et l'activité de l'eau, supposés variables au cours du temps, selon un modèle polynomial de degré 4 ajusté sur des données expérimentales collectées à partir du ressuyage, et dont les paramètres sont propres au cœur et à la surface du produit.

Si  $A(t)$  est l'âge du produit à l'instant  $t \in [0, d_E]$ , alors la valeur du paramètre physico-chimique  $X$  (pH ou aw en cœur ou en surface) à l'instant  $t \in [0, d_E]$  est donné par :

$$X(t) = f(A(t) - A_{\text{saumurage}}) \text{ où } f(t) = \alpha_1 t^4 + \alpha_2 t^3 + \alpha_3 t^2 + \alpha_4 t + \alpha_5 \text{ pour tout } t > 0$$

0Le taux de croissance des cellules dépendant des conditions environnementales physico-chimiques, nous vérifions au préalable si elles sont favorables ou non sur l'intervalle de temps considéré. On cherche ainsi l'ensemble  $\{t \in [0, d_E] / X_{\min} < X(t) < X_{\max}\}$ .

Les valeurs cardinales minimales et maximales du modèle secondaire de croissance pour *L. monocytogenes* sont fournies par (Augustin et al., 2005) et reportées dans le Tableau 27.

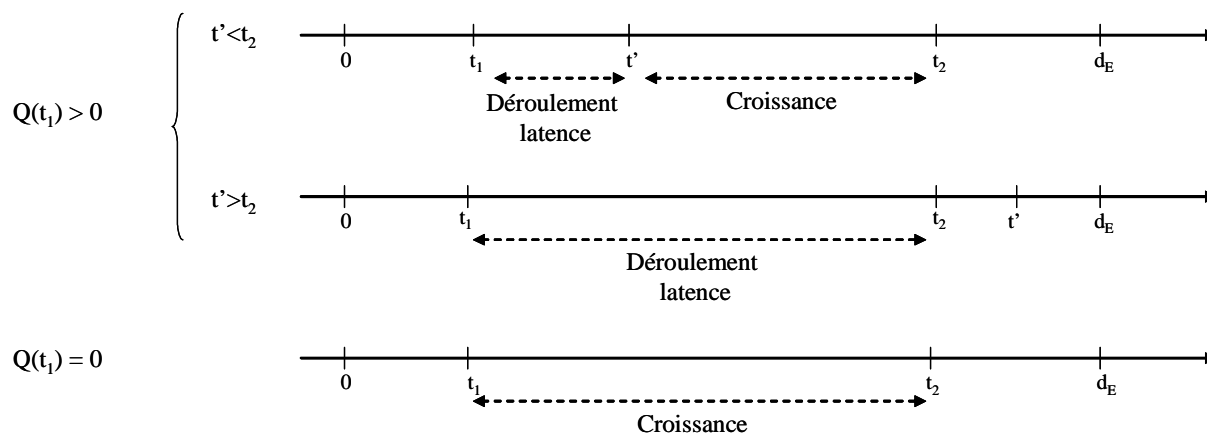
**Tableau 27 Valeurs des paramètres du modèle de croissance pour *L. monocytogenes* dans les fromages**  
(Source : (Augustin et al., 2005))

Paramètres	Valeurs
$\mu_{\text{opt}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,212
$T_{\text{min}}^{\circ}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	-1,72
$T_{\text{max}}^{\circ}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	45,5
$\text{pH}_{\text{min}}$	4,71
$\text{pH}_{\text{max}}$	9,61
$\text{aw}_{\text{min}}$	0,913
$\text{aw}_{\text{max}}$	1
$T_{\text{opt}}^{\circ}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	37
$\text{pH}_{\text{opt}}$	7,1
$\text{aw}_{\text{opt}}$	0,997

Pour les valeurs des paramètres physico-chimiques environnementales, cet ensemble est donné par un intervalle  $[t_1 \ t_2] \ [0 \ d_E]$ .

#### Modélisation de la croissance

SI  $t_1 \neq 0$  et  $t_2 \neq d_E$ , chercher  $T(d_E)$  et  $Q(d_E)$ , sorties de l'étape E, en fonction de  $T(0)$  et  $Q(0)$ , sorties de l'étape précédente, revient à chercher  $T(t_2)$  et  $Q(t_2)$  en fonction de  $T(t_1)$  et  $Q(t_1)$ . Deux cas de figure se présentent (Figure 49).



**Figure 49 Application du modèle de croissance en fonction de l'état physiologique des cellules dans les produits**

- Cas  $Q(t_1) > 0$

On cherche dans un premier temps l'instant  $t'$  tel que  $Q(t') = 0$  :

Soit  $Q(t_1)$ , le travail à accomplir au temps  $t_1$ . On a, pour tout  $t \in [t_1, t_2]$ ,  $Q(t) = Q(t_1) - \int_{u=t_1}^t \mu(u) du$  (cf. paragraphe II.A.1.d du Chapitre III). Ainsi, une dichotomie sur  $[t_1, t_2]$  permet de trouver rapidement :

$$\{t' / Q(t_1) - \int_{u=t_1}^{t'} \mu(u) du = 0\}$$

Le calcul de cette intégrale se base sur la méthode d'intégration numérique de Simpson, la complexité de la fonction  $\mu$  ne permettant pas de trouver la solution analytique de cette intégrale.

Si  $t' < t_2$ , le travail à accomplir à l'instant  $t'$  est nul et la multiplication des cellules se produit entre  $t'$  et  $t_2$ , selon le système différentiel suivant :

$$\begin{cases} \frac{dT}{dt}(t) = \mu(t) \cdot T(t) \cdot \left(1 - \frac{T(t)}{X_{\max}}\right) & \text{si } t \in [t', t_2] \\ T(t) = T(t_1) & \text{si } t = t' \end{cases}$$

$T(t_2)$  s'obtient par résolution de l'équation différentielle ordinaire sur l'intervalle  $[t', t_2]$  par intégration numérique (du fait de la complexité de la fonction  $\mu(t)$ ). La fonction  $\mu(t)$  étant continue avec des variations lentes, on utilise une méthode à pas constant, l'algorithme de Runge-Kutta

Dans ce cas,  $T(t_1) \neq T(t_2)$ ,  $Q(t_1) > 0$  et  $Q(t_2) = 0$ .

Si  $t' > t_2$ , il existe encore à l'instant  $t_2$  un travail à accomplir avant d'entamer la phase exponentielle.

Dans ce cas,  $T(t_1) = T(t_2)$ ,  $0 < Q(t_2) = Q(t_1) - \int_{u=t_1}^{t_2} \mu(u) du < Q(t_1)$ .

- Cas  $Q(t_1) = 0$

Il n'existe pas de travail à accomplir par les cellules de la colonie avant d'entrer en phase exponentielle. On applique alors le modèle de croissance entre les instants  $t_1$  et  $t_2$  selon le système différentiel suivant, et en utilisant l'algorithme de Runge-Kutta :

$$\begin{cases} \frac{dT(t)}{dt} = \mu(t).T(t).\left(1 - \frac{T(t)}{X_{\max}}\right) & \text{si } t \in [t_1, t_2] \\ T(t) = T(t_1) & \text{si } t = t_1 \end{cases}$$

Dans ce cas, on a :  $T(t_1) \neq T(t_2)$  et  $Q(t_1) = Q(t_2) = 0$ .

## b. Environnement

Dans le milieu de l'environnement, des colonies sont présentes depuis un temps plus ou moins long. Les colonies du milieu du hâloir proviennent du milieu de la salle de soins. Certaines d'entre elles sont en présence de nutriments (cf. paragraphe I.D.3 de ce chapitre). Ces dernières se multiplient sous forme de colonies.

Au cours d'une journée de fabrication, *Lo* lots de produits sont fabriqués. Les lots déjà présents dans l'usine mûrissent en hâloir et peuvent aussi passer à l'étape de soins, en fonction de leur avancement dans le procédé de fabrication. Les colonies présentes dans l'environnement au début de cette journée sont potentiellement recontaminantes pour les lots qui subiront l'étape des soins.

Pour des raisons de simplification du modèle, la croissance des colonies de l'environnement est appliquée à la fin de la journée de fabrication, c'est-à-dire après le retour du dernier lot soigné de la journée en hâloir. Ainsi, les colonies recontaminantes de la journée ne subissent pas la croissance. Cependant, pour une probabilité de recontamination faible, l'impact de cette approximation sur les résultats est minime. Pour les autres colonies, la croissance est simulée sur 24 heures, leur taille en début de croissance étant celle en début de journée.

Soit donc une colonie présente dans l'environnement à la fin d'une journée de fabrication, c'est-à-dire, suivant le retour du dernier lot soigné de la journée. Considérons l'échelle de temps « Heure » dont l'origine 0 correspond à la première heure suivant le retour du dernier lot soigné de la journée précédente. Cette colonie est caractérisée, à l'instant  $t$ , par sa taille  $T(t)$  et sa quantité de travail avant reprise de croissance  $Q(t)$ . Les colonies croissent indépendamment les unes des autres.

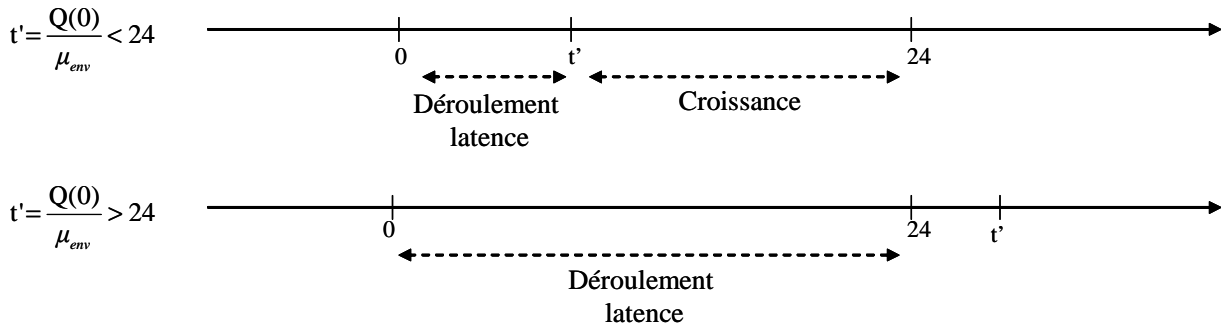
Nous cherchons à connaître les valeurs  $T(24)$  et  $Q(24)$ , sachant  $T(0)$  et  $Q(0)$ . Le modèle de croissance appliqué est le modèle exponentiel (McMeekin et al., 1993), décrit par l'Équation 7. Ce modèle suppose que le taux de croissance  $\mu_{env}$  dans l'environnement est constant. La phase exponentielle débute à l'instant  $t'$  tel que  $Q(t') = 0$  et l'inoculum à cet instant correspond au nombre initial de cellules dans la colonie  $T(0)$ .  $X_{\max}$  est fourni par l'utilisateur, et nous avons considéré qu'il n'excède a priori pas  $10^5$ , comme dans le cas des matrices alimentaires.  $\mu_{env}$  est lui-même calculé à partir du temps de génération des cellules  $T_g$  ( $\mu_{env} = \ln(2)/T_g$ ), fourni par l'utilisateur.



$$\text{pour tout } t \in [0, 24] \begin{cases} \frac{dT}{dt}(t) = 0 & \text{si } t/Q(t) > 0 \text{ ou } T(t) = X_{\max} \\ \frac{1}{T(t)} \times \frac{dT}{dt}(t) = \mu_{\text{env}} & \text{si } t/Q(t) = 0 \text{ et } T(t) < X_{\max} \\ T(t) = T(0) & \text{si } t = 0 \end{cases}$$

#### Équation 7 Modèle exponentiel de croissance dans l'environnement

L'instant  $t'$  tel que  $Q(t') = 0$  est donné par  $\frac{Q(0)}{\mu_{\text{env}}}$  (cf. paragraphe II.A.1.d du Chapitre III). Deux cas se profilent alors (Figure 50):



**Figure 50** Application du modèle de croissance dans l'environnement en fonction de l'état physiologique des cellules

$$\text{- Cas } \frac{Q(0)}{\mu_{\text{env}}} < 24$$

Le temps de latence avant reprise de la croissance, en heures, étant inférieur au temps possible de croissance (24 heures), on applique le modèle de croissance entre la fin de la phase de latence (donnée par  $\frac{Q(0)}{\mu_{\text{env}}}$ ) et la 24<sup>ième</sup> heure selon le système différentiel suivant :

$$\begin{cases} \frac{dT}{dt}(t) = 0 & \text{si } T(t) = X_{\max} \\ \frac{1}{T(t)} \times \frac{dT}{dt}(t) = \mu_{\text{env}} & \text{si } t \in [\frac{Q(0)}{\mu_{\text{env}}} \quad 24] \\ T(t) = T(0) & \text{si } t = \frac{Q(0)}{\mu_{\text{env}}} \end{cases}$$

La résolution analytique de ce système donne :  $T(24) = \max(X_{\max}, T(0) \times e^{24 \times \mu_{\text{env}} - Q(0)})$  et  $Q(24) = 0$ .

$$\text{- Cas } \frac{Q(0)}{\mu_{env}} > 24$$

Le temps de latence avant reprise de la croissance, en heure, étant supérieur au temps possible de croissance (24 heures), on a :  $Q(24) = Q(0) - 24 \times \mu_{env}$  et  $T(24) = T(0)$ .

## 8) Application des stress

Au cours du procédé de fabrication, les cellules d'une colonie peuvent subir des stress impliquant une modification de leur état physiologique caractérisé par une réduction de la taille des colonies et/ou une modification de l'état physiologique des cellules survivantes impliquant une augmentation de la quantité de travail avant d'entrer en phase exponentielle.

Nous distinguons deux types de stress :

- Les stress liés à la phase de fabrication, depuis le pré-emprésurage à la levuration. Ces stress s'appliquent aux cellules ou colonies de l'environnement contaminant les unités de production.
- Les stress liés à la phase d'affinage. Ces stress s'appliquent aux colonies présentes dans l'environnement d'affinage.

Pour le premier type, nous décrivons en détail la procédure d'application dans ce paragraphe ; pour le second type de stress, la procédure d'application est déjà décrite dans le paragraphe du phénomène associé au stress (cf. paragraphes I.D.7 et I.D.9 de ce chapitre). Dans les deux cas, nous donnons les valeurs expérimentales utilisées pour l'ensemble de ces stress.

### *En phase de fabrication*

La quantité de travail avant reprise de croissance induite par le stress dépend de plusieurs facteurs :

- l'état physiologique initial des cellules recontaminantes :

Les cellules recontaminantes peuvent avoir été privées de nutriments et/ou avoir subi une opération d'hygiène (e.g. les cellules provenant du milieu de l'environnement). A contrario, les cellules peuvent ne pas avoir subi de stress particulier avant recontamination (e.g. elles proviennent des mains des opérateurs par exemple).

- l'étape durant laquelle se produit la recontamination :

Les cellules présentes dans une unité de production en fabrication peuvent subir une succession de différents types de stress, en fonction de l'étape à laquelle se produit la recontamination : entre les étapes de pré-emprésurage et de post-emprésurage, le pH du caillé chute brutalement ; s'ensuit une longue période au cours de laquelle le pH est maintenu à un niveau bas (généralement inférieur à 5) et dont la remontée commence vers l'étape de ressuyage.

- la localisation des cellules :

Les cellules présentes dans le lait sont, au moment du moulage, transférées, soit à la surface du produit, soit dans le cœur du produit. Les cellules ne subissent alors pas les mêmes conditions physico-chimiques environnementales, la différence principale étant le stress salin, au moment de salage et appliqué aux cellules de surface uniquement.

Soit un scénario  $S$  correspondant à une succession de stress subis par des cellules recontaminantes à l'étape  $E_h$ , où  $E_h$  est la  $h^{\text{ième}}$  étape de la phase de fabrication. Les caractéristiques de recontamination de ces cellules sont données par le couple  $(C(E_h), Q(E_h))$ . Les conséquences de l'étape  $E_h$  sur l'état physiologique des cellules recontaminantes sont modélisées par la fonction  $f_h$ , pour  $h = 1$  à  $2$  et par les fonctions  $g_h^1$  et  $g_h^2$ , pour les cellules présentes en surface et en cœur respectivement, et pour  $h = 4$  à  $10$ . Les conséquences des conditions physico-chimiques subies successivement, selon le scénario  $S$ , par les cellules recontaminantes sont résumées par les valeurs globales  $Q_s$ , correspondant à une quantité de travail avant reprise de croissance, et  $RD_s$ , au nombre de réductions décimales de la population microbienne.

Quelque soit l'étape de recontamination, on applique aux cellules recontaminantes la quantité de travail  $Q_s$ . Par contre, l'impact de la succession de stress sur la concentration de la population microbienne dépend de l'étape  $h$  de recontamination :

- Pour  $h = 1$  à  $2$ , le moulage se produit pour une concentration suivant une loi binomiale de paramètres  $C(E_h)$  et  $10^{-RD_s}$ ,
- Pour  $h = 4$  à  $10$ , le nombre de cellules recontaminantes par produit est réduit et suit une loi binomiale de paramètre  $C'(E_h)$  et  $10^{-RD_s}$ .

### *En phase d'affinage*

Un stress est appliqué aux cellules de l'environnement de la phase d'affinage pour deux scénarios :

- Lorsque les cellules subissent une opération d'hygiène
- Lorsqu'elles subissent une période prolongée sans nutriment.

Si le travail à accomplir issu d'un stress précédent n'est pas nul, on suppose que le nouveau stress annule le précédent.

Soit donc les couples  $(T_{av}, Q_{av})$  et  $(T_{ap}, Q_{ap})$  les caractéristiques d'une colonie présente dans l'environnement d'affinage respectivement avant et après application du stress d'un scénario  $S$ . Soit de plus  $Q_s$  et  $T_s$  respectivement la quantité de travail à accomplir avant reprise de croissance et le nombre de réductions décimales de la taille de la colonie, induits par le stress. On a alors :

$$- T_{ap} = T_{av} \times 10^{-RD_s}$$

$$- Q_{ap} = Q_s$$

#### *Valeur des paramètres*

Laurent Guiller, dans le cadre de sa thèse (Guillier, 2005), a testé expérimentalement l'impact sur *L. monocytogenes* de divers protocoles expérimentaux, en tentant de reproduire les conditions réelles d'une industrie fromagère. L'ampleur de la phase de latence et le nombre de réductions décimales de la population microbienne résultant de chaque protocole ont été quantifiés. Le Tableau 28 fournit, pour chacun, le temps de latence  $L$ , pour des conditions de re-croissance données (la température, le pH, l'activité de l'eau et la matrice d'accueil), et le nombre de réductions décimales  $RD$ .

Pour tenir compte de la variabilité des temps de latence cellulaires de *L. monocytogenes*,  $L$  est donné sous forme d'une distribution de probabilité des valeurs extrêmes de paramètre de forme fixé à 5 (ou distribution EVII<sub>5</sub>) (Équation 8), et dont les autres paramètres sont fournis dans le Tableau 28.

$$y = f(x/a, b) = \frac{5}{b} \left( \left( \frac{x-a}{b} \right)^{-6} \cdot \exp \left( \left( \frac{x-a}{b} \right)^{-5} \right) \right)$$

**Équation 8 Densité de probabilité de la distribution EVII<sub>5</sub>.  $a$  et  $b$  sont les paramètres de location et d'échelle respectivement et le paramètre de forme est égal à 5**

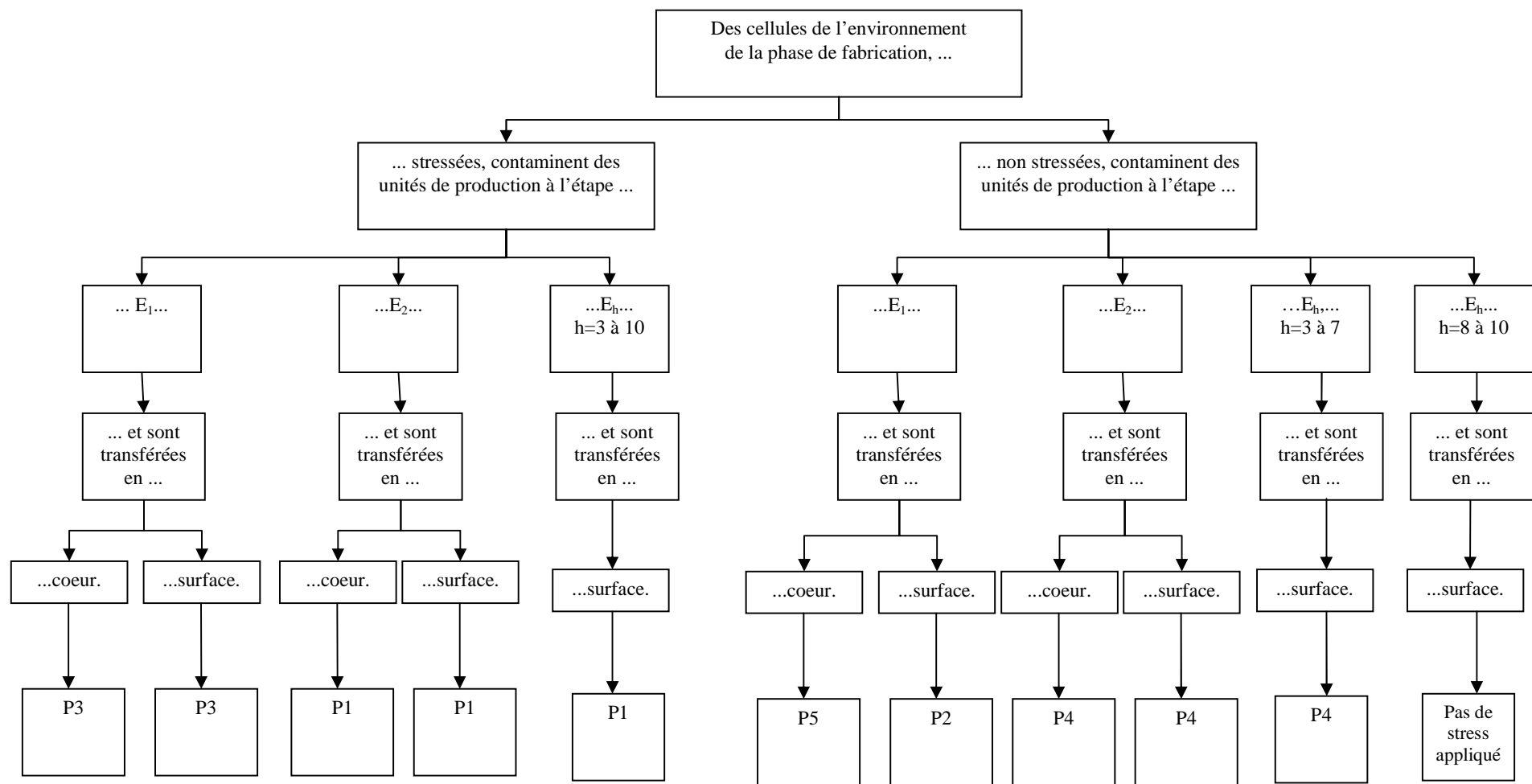
La procédure de calcul de la quantité de travail  $Q$  associée à un temps de latence  $L$  et des conditions de re-croissance CRC donnés est la suivante :

- Tirage au sort d'une valeur de temps de latence  $l$  dans la distribution de probabilité,
- Calcul du taux de croissance  $\mu_{CRC}$  pour les CRC données avec le modèle de croissance secondaire fournit par l'Équation 3 du chapitre III.
- Calcul de la quantité de travail à accomplir  $Q$  en fonction de  $l$  et  $\mu_{CRC}$ , avec l'Équation 4 du chapitre III.

#### *Choix des valeurs expérimentales associées à un scénario de stress*

La Figure 51 illustre les divers scénarios possibles de succession de stress, en phase de fabrication, et les résultats des protocoles expérimentaux que nous avons choisi d'associer à chaque scénario. Il n'existe pas forcément un protocole expérimental pour un scénario. C'est la raison pour laquelle certains protocoles expérimentaux sont associés à des scénarios différents, dont on suppose les conséquences proches.

En phase d'affinage, il existe deux types de stress possibles - absence de nutriments et opération d'hygiène - auxquels sont respectivement associés les couples de valeurs caractéristiques ( $Q_{\text{nutri}}$ ,  $RD_{\text{nutri}}$ ) et ( $Q_{\text{Hyg}}$ ,  $RD_{\text{Hyg}}$ ). Les valeurs expérimentales de  $RD_{\text{nutri}}$  et  $RD_{\text{Hyg}}$  sont fournies dans le Tableau 28 et celles de  $Q_{\text{nutri}}$  et  $Q_{\text{Hyg}}$  sont déductibles des paramètres des distributions  $L_{\text{nutri}}$  et  $L_{\text{Hyg}}$  du Tableau 28.



**Figure 51 Scénario de succession de stress possibles lorsque la recontamination se produit en phase de fabrication et protocoles expérimentaux permettant le calcul des valeurs caractéristiques associées. L'arbre se lit de haut en bas. Les protocoles expérimentaux P1 à P5 sont décrits dans le Tableau 28.**

**Tableau 28 Valeurs caractéristiques résultant d'un stress environnemental sur *L. monocytogenes* (source : (Guillier, 2005))**

Type de stress (Phase)		Stress simple (Affinage)		Succession de stress (Fabrication)				
Nom du protocole expérimental		Nutri (Absence de nutriments)	Hyg (Opération d'hygiène)	P1**	P2	P3	P4****	P5
Conditions de Re-croissance (CRC)	T°	30		30				
	pH	7		7				
	avant	0,997		0,997				
	Matrice d'accueil ( $\mu_{opt}$ )	gélose (1,154)		gélose (1,154)				
Taux de croissance	$\mu_{CRC}$	0,9644		0,9644				
Perte de cultivabilité résultant du stress S	RD <sub>S</sub>	1,5	1,5*	4,3				
Paramètres de la distribution du temps de latence L <sub>S</sub> résultant du stress S	A(L <sub>S</sub> )	-12,062	-5,197	cf. absence nutriments ou opérations d'hygiène	-4,523	-8,914	-4,789	-2,182
	B(L <sub>S</sub> )	17,737	9,347		7,130	13,387	7,422	3,423

\*Cette valeur est intégrée dans le nombre de réductions décimales induites par l'efficacité de l'opération d'hygiène

\*\*Correspond à la recontamination du lait après emprésurage par des cellules stressées. L'impact de l'acidification est supposé négligeable par rapport au stress environnemental.

\*\*\*Les cellules deviennent résistantes après l'opération d'hygiène d'où un nombre de réductions décimales plus faible que pour le protocole expérimental P2

\*\*\*\*Les cellules de *L. monocytogenes* sont immergées pendant 24 heures dans de la saumure. Ce protocole expérimental correspond donc théoriquement au cas d'une saumure contaminée en début de journée qui contamine des produits issus d'un lot de fin de journée (la saumure est filtrée en fin de journée). Nous l'appliquons au cas de cellules qui ont contaminé la surface des produits après l'emprésurage jusqu'au saumurage.

## 9) Mesure de maîtrise

Les mesures de maîtrise prises en compte dans ce modèle sont les plans de contrôle et les opérations d'hygiène dans l'environnement. Les opérations d'hygiène sont principalement caractérisées par leur fréquence et leur intensité et les plans de contrôle par les plans d'échantillonnage mis en place dans l'environnement et dans les produits. Concernant les plans de contrôle, nous nous intéressons au cas de la recherche de *L. monocytogenes* et évaluons l'efficacité des mesures de maîtrise lorsque l'usine fonctionne sous deux types de régimes :

- Régime standard : aucune contamination n'est détectée par le plan de contrôle, ni dans l'environnement, ni dans les produits,
- Régime renforcé : les actions correctives appliquées lorsque certaines analyses microbiologiques ne sont pas conformes. Ces actions correctives se traduisent par une modification de la fréquence et de l'intensité des mesures d'hygiène et une modification des plans d'échantillonnage dans l'environnement et/ou dans les produits.

Dans le modèle, le passage du régime normal au régime renforcé se produit lorsqu'une analyse, de l'environnement ou d'un produit fini, est positive. Le modèle ne permet pas le passage du régime renforcé au régime standard.

### a. Modalités d'application des mesures de maîtrise

Les plans de contrôle et la fréquence des mesures d'hygiène sont basés sur la définition d'un *lot*. En régime standard, un lot est défini comme un ensemble de produits fabriqués le même jour, selon la même technologie et ayant le même format. Il est composé de P produits.

En régime renforcé, la définition du lot est modifiée : un lot est un ensemble de produits qui ne sont pas « séparés » par une opération d'hygiène. Ainsi, les *sous-lots* du régime standard, contenant chacun *NFSLo* produits, deviennent des lots en régime renforcé (Tableau 29).



**Tableau 29 Mesures de maîtrise en régimes standard et renforcé**

Mesure de maîtrise	Caractéristiques	Régime standard	Régime renforcé
Plan de contrôle Produit	Définition du lot	Lot	Sous-lot
	Echantillonnage	$NbEchL$	$NbEchL + AnaProdSupp$
Plan de contrôle Environnement	Nombres d'analyses du milieu de l'environnement par semaine	$NbAnaE$	$NbAnaE + n \times AnaEnvSupp$ , où n correspond au nombre de semaines écoulées depuis la première analyse non conforme
	Analyse de la machine de soins	Une fois par jour, analyse du bac de récupération au passage d'un produit (choisi aléatoirement dans un sous-lot, lui-même issu d'un lot)	Une fois par jour, analyse du bac de récupération au passage d'un produit (choisi aléatoirement dans un sous-lot, lui-même issu d'un lot)
	Analyse de la machine d'emballage	Une analyse par semaine en fin de journée	Une analyse par jour en fin de journée
	Fréquence machine soins	Entre les lots et entre les sous-lots (au sens du régime standard)	Entre les lots (au sens du régime renforcé)
Opérations d'hygiène	Fréquence machine emballage	une par jour, fin de journée	une par jour, fin de journée
	Fréquence milieu hâloir	Tous les $NDHa$ jours	Tous les $NDHa$ jours
	Efficacité de l'opération d'hygiène de l'élément M en nombre de réductions décimales	$eff_M$	$eff_M + RDSupp$

**b. Plan de contrôle**

Dans l'environnement de l'usine sont analysés : le milieu du hâloir, les machines de soins et d'emballage (par l'intermédiaire de la morge présente sur les machines), la solution de soins.

*Nombre d'analyses*

Concernant le milieu du hâloir, les prélèvements sont effectués dans des zones dites à risque (égouts, zone de circulation, climatiseurs, chariots, sols), mais nous considérons qu'ils sont effectués en des endroits aléatoires et que les colonies du milieu du hâloir sont réparties aléatoirement sur sa surface (cf. Chapitre II).  $NbPrélSe$  prélèvements sont effectués par semaine. En régime standard,  $NbPrélSe = NbAnaE$ . Lors du passage au régime renforcé, c'est-à-dire, si au moins une analyse s'est avérée non-conforme pour *L. monocytogenes* (présence), le nombre d'analyses est augmenté de  $AnaEnvSupp$ . Si, au cours d'une semaine, *L. monocytogenes* est détectée dans le milieu du hâloir (au moins une analyse non-conforme un jour de la semaine),  $NbPrélSe$  est augmenté de  $AnaEnvSupp$  chaque semaine suivant la première analyse non conforme,

de telle sorte que  $NbPrélSe = NbAnaE + n \times AnaEnvSupp$ , où  $n$  correspond au nombre de semaine écoulées depuis la première analyse non-conforme.

Les  $NbPrélSe$  prélèvements sont, soit répartis sur les trois premiers jours de la semaine ( $typePC = 1$ ), soit effectués au même moment, un jour de la semaine choisi aléatoirement ( $typePC = 2$ ). Généralement, les prélèvements sont effectués après emballage de l'ensemble des lots de la journée et avant l'opération d'hygiène du milieu du hâloir, le cas échéant. Le nombre de prélèvements par jour  $NbPreIJ$  dépend du nombre de prélèvements par semaine et du type de plan de contrôle (Tableau 29).

Les machines de soins est analysée une fois par jour et la machine d'emballage est analysée une fois par semaine (Tableau 29).

### *Probabilité de détection*

L'aire de la surface totale du milieu du hâloir unique et l'aire de la surface prélevée pour un échantillon sont déterminées par l'utilisateur et supposées égales respectivement à  $stot$  et  $sana$ . De même la sensibilité  $Se$  et la spécificité  $Sp$  du test sont déterminées par l'utilisateur. De plus, on suppose qu'il n'existe qu'une seule colonie par  $cm^2$ .

Pour un milieu contenant  $N$  colonies, le nombre de colonies détectées dans une journée d'analyse donnée et pendant laquelle sont effectués  $NbPreIJ$  prélèvements suit une loi de Poisson de paramètre  $C \times sana \times NbPreIJ$ , où  $C$  est la concentration du milieu en colonies égale au nombre de colonies dans le milieu de l'environnement divisé par  $Stot$ . Ainsi, la probabilité  $P_{détect}$  de détecter au moins une colonie dans un échantillon est égale à la probabilité qu'au moins une colonie soit détectée, c'est-à-dire,

$$P_{détect} = 1 - e^{-NbpreIJ \times sana \times C}.$$

Par ailleurs, un échantillon de solution de soin rejetée dans le bac de récupération est analysé une fois par jour, au cours du traitement d'un produit d'un sous-lot, lui-même issu d'un lot, tous étant choisis aléatoirement: lors de cette analyse, si au moins une colonie est transférée du compartiment M au compartiment E1, l'analyse est non conforme. Enfin, la machine d'emballage est analysée une fois par jour au cours de l'emballage d'un produit d'un lot, lot et produit étant choisis aléatoirement. Si au moins une colonie est présente dans le compartiment M au passage de ce produit, l'analyse n'est pas conforme. Une analyse non-conforme implique le passage au plan de contrôle renforcé.

Pour une journée de fabrication donnée, on obtient donc plusieurs résultats concernant l'environnement :

- Un nombre d'analyse dans l'environnement, nul ou positif, et le nombre d'analyses non-conformes, ainsi que la probabilité de détection d'une colonie donnée par  $P_{détect}$ .
- Un résultat d'analyse de la solution de soins : positif ou négatif
- Un résultat d'analyse de la machine d'emballage : positif ou négatif

Le plan de contrôle par attribut simple appliqué aux produits finis après l'étape d'emballage consiste à prélever  $NbEchL$  échantillons d'un lot choisi aléatoirement (un échantillon par produit). On considère que l'ensemble de la surface d'un produit est analysé et que, si cette surface est contaminée, au moins une colonie est détectée, (sensibilité et spécificité du test parfaites), l'analyse étant alors non-conforme. Les résultats sont le nombre total de produits analysés et le nombre de produits contaminés, par lot, au sens du lot défini en régime standard. Le pourcentage de produits contaminés en résultant permet de décider de la conformité du lot.

Afin d'établir une correspondance entre la prévalence de contamination dans l'environnement et celle des produits, pour une journée de fabrication, nous avons choisi de considérer les résultats relatifs à une journée de fabrication (l'ensemble des lots d'une journée), c'est-à-dire, le nombre total de produits analysés pour une journée de fabrication et le nombre de produits contaminés parmi eux.

### c. Mesures d'hygiène

Les modifications des fréquences des opérations d'hygiène, lors du passage du régime standard au régime renforcé, pour les éléments de l'environnement d'affinage sont données dans le Tableau 29. Seule la fréquence des opérations d'hygiène sur la machine de soins est modifiée lors du passage en régime renforcé. Le nombre de réductions décimales  $eff_M$  associé à chaque élément de l'environnement en régime standard est augmenté de  $RDSupp$  en régime renforcé.

## II. Implémentation du modèle

Le modèle a été implémenté sous MATLAB 7.1 (R14) Un fichier principal fait appel à des fonctions simulant chaque étape du procédé. Plusieurs milliers de lignes de codes constituent ces fichiers. La saisie des valeurs des paramètres par l'utilisateur du modèle de simulation s'effectue par l'intermédiaire d'une interface que nous présentons dans ce paragraphe.

### A. Interface n°1 : Paramètres liés à la phase de fabrication et paramètres physicochimiques du produit

L'ensemble de ces paramètres apparaît dans l'interface représentée sur la Figure 52.

#### 1) Paramètres d'une primo-contamination en phase de fabrication

Pour toutes les étapes de la phase de fabrication où la recontamination est possible, les entrées sont :

- l'indice  $Recont_h$  indiquant s'il y a recontamination ou non à cette étape ( $Recont_h = 1$  si recontamination ; 0 sinon)
- la quantité de travail des cellules recontaminantes  $Q(E_h)$
- les indices des jours  $I_j$  pour lesquels le scénario de primo-contamination en phase de fabrication se produit

Pour les étapes précédant le moulage ( $h = 1$  à  $2$ ), les entrées sont :

- la concentration des bactéries contaminantes  $C(E_h)$  si il y a recontamination (en nombre de bactéries par litre)
- les indices des bassines contaminées  $I(E_h)$

Pour les étapes suivant le moulage,  $h = 4$  à  $10$ , les entrées sont :

- la concentration des bactéries contaminantes  $C'(E_h)$  (en nombre de bactéries par surface de produit)
- les indices des produits contaminés  $I'(E_h)$

La quantité de travail à accomplir des cellules recontaminantes  $Q(E_h)$  correspond à une succession de stress subis par les bactéries et dépendant des conditions environnementales initiales et du procédé de fabrication. Pour chaque itération, une valeur est tirée au sort dans la distribution du temps de latence correspondant au protocole expérimental reproduisant cette succession de stress, fournie dans le Tableau 28. La quantité de travail  $Q(E_h)$  est calculée à partir de cette valeur et du taux de croissance correspondant aux conditions de re-croissance du protocole (Tableau 28). Cette quantité de travail est modifiable dans le programme-source.

## 2) Paramètres du procédé en phase de fabrication

Les entrées du modèle pour le procédé en phase de fabrication sont les suivantes :

- les paramètres de production :  $L$ ,  $VB$ ,  $LF$
- pour l'étape E, la durée de l'étape,  $d_E$

## 3) Paramètres physico-chimiques du produit

Les paramètres physico-chimiques du produit sont:

- la température pendant l'étape E de la phase de fabrication,  $T_E^\circ$ , commune au cœur et à la croûte
- les paramètres du polynôme de degré 4 modélisant l'évolution du paramètre physico-chimique  $\Omega$  ( $\Omega$  = pH ou aw) au cours du temps et à partir du saumurage :  $\alpha_i$ ,  $i = 1$  à  $4$

Etapes fabrication	Durée	Température	Recontamination	Concentration	Vecteur des bassines ou produit contaminés
Pré-emprésurage	1	35	0	0	0
Post-emprésurage	1.36	35	0	0	0
Egouttage	23	35	0	0	0
Haloir acidification	0	34	0	0	0
Refroidissement	0	20	0	0	0
Saumurage ou salage à sec	1.75	12	0	0	0
Ressuyage	24	12.5	0	0	0
Séchage	0	0	0	0	0
Levuration	72	0	0	0	0

Paramètres pH	
Croute	Coeur
a = 6e-013	a = 7.0924e-013
b = -2.7425e-009	b = -3.8477e-009
c = 3.0537e-006	c = 6.9656e-006
d = 0.0013878	d = -0.0031901
e = 5.4011	e = 5.4094

Paramètres aw	
Croute	Coeur
a = 2.6104e-014	a = 1.5113e-014
b = -9.6076e-011	b = -5.0835e-011
c = 1.1949e-007	c = 5.4784e-006
d = -6.9288e-005	d = -4.8159e-005
e = 0.95965	e = 0.96303

Jour d'application du scénario de primo-contamination en phase de fabrication:

Haloir pré-emballage: 
 Température transport / stockage:

Nombre de litres de lait total: 
 Nombre de litres par produit: 
 Volume des bassines (litres):

Figure 52 Interface n°1 regroupant les paramètres du scénario de primo-contamination et du procédé en phase de fabrication et les paramètres physico-chimiques du produit

## B. Interface n°2: Paramètres liés à la phase d'affinage et paramètres généraux d'une simulation

L'ensemble de ces paramètres apparaît dans l'interface représentée sur la Figure 53.

### 1) Paramètres généraux d'une simulation

Les paramètres généraux d'une simulation sont :

- le nombre de jours  $Nb_j$  pendant lesquels on souhaite évaluer les conséquences de la primo-contamination
- le nombre d'itérations  $NbIter$  (idéalement élevé)
- le nom du répertoire de sauvegarde des résultats

### 2) Paramètres de procédé liés à la phase d'affinage

Les paramètres de procédé liés à la phase d'affinage sont :

- Les paramètres liés à la présence des fromages dans les hâloirs : le nombre de cycles hâloir/soins  $CSH$ , la durée de passage dans les hâloirs en heures  $Tha$ , la température des hâloirs d'affinage  $T^{\circ}_{Affinage}$ , le nombre de hâloirs dans l'usine  $Ha$ .
- Le nombre de lots pour une journée de fabrication  $Lo$
- L'âge du produit en heures au moment de la consommation  $AgeCons$ . La croissance des cellules est simulée jusqu'à cet âge.

### 3) Paramètres liés aux mesures d'hygiène

Les paramètres des mesures d'hygiène sont le degré d'efficacité d'une opération d'hygiène pour l'élément M,  $eff_M$ , le nombre de réductions décimales supplémentaires lors du passage en régime renforcé  $RDSupp$ , la fréquence des opérations d'hygiène de l'environnement de la salle de soin et du milieu de l'environnement d'affinage, en régime standard, respectivement  $NDMES$  et  $NDHa$ .

### 4) Paramètres d'une primo-contamination en phase d'affinage

En phase d'affinage, le scénario de primo-contamination concerne les machines de soins et/ou d'emballage, et/ou le milieu de l'environnement d'affinage. L'utilisateur saisit le nombre de cellules présentes  $NbCell_M$  sur l'élément M. Ce scénario de primo-contamination de l'environnement de la zone affinage se produit le premier jour d'une itération.

De même qu'en phase de fabrication, les cellules ont une quantité de travail à accomplir correspondant à un scénario de stress dépendant des conditions environnementales. Cette valeur est fixée de manière arbitraire pour tous les éléments de l'environnement d'affinage dans le programme-source, mais peut être modifiée.

### 5) Paramètres liés au transfert et la croissance des microorganismes

Pour la croissance, les paramètres sont la taille maximale des colonies  $Xmax$ , le pourcentage de colonies pouvant croître dans l'environnement  $p_{crois}$ , le temps de duplication d'une cellule dans un hâloir  $Tg$ .

Pour le transfert, les paramètres sont la probabilité qu'une colonie du milieu de l'environnement contamine un produit  $p_{cont}$ , la probabilité qu'une colonie de l'environnement de la salle des soins contamine le milieu de l'environnement  $p_{sh}$ .

The screenshot shows a software window titled 'def4' with a blue title bar. The interface is divided into several sections with input fields and buttons. The parameters are as follows:

Parameter	Value	Parameter	Value
Degré d'efficacité du lavage Environnement *	2	Primo-contamination du milieu de l'environnement d'affinage (nb de cellules)	2000
Degré d'efficacité du lavage Machines *	3	Primo contamination de la machine d'emballage (nb de cellules)	0
Nombre de réductions décimales supplémentaires en régime renforcé	1	Primo contamination de la machine de soin (nb de cellules)	0
Fréquence des opérations d'hygiène dans le milieu de l'environnement d'affinage	50		
Nombre de fromages traités entre deux lavages machine de soins *	8750		
Durée de passage dans les haloirs (h) *	132		
Nombre de cycles haloir/soins*	4		
Température des haloirs d'affinage *	13		
Nombre de sous-lots par lot (au sens du régime standard)	3		
Nombre de haloirs d'affinage	4		
Nombre de jours	200		
Age du produit au moment de la consommation	1600		
		Taille maximale des colonies	10 <sup>5</sup>
		Probabilité(Transfert colonie Environnement / Produit) *	0.000001
		Probabilité (transfert colonie Salle Soins / Haloir) *	0.05
		Pourcentage de colonies de l'environnement qui croissent *	0.7
		temps de génération dans les haloirs (h) *	24

Buttons: 'Sauvegarder et lancer la simulation' (center), 'results' (top right).

Figure 53 Interface n°2 regroupant les paramètres généraux de la simulation et les paramètres liés à la phase d'affinage

### C. Interface n°3 : Paramètres liés aux mesures de maîtrise

L'ensemble de ces paramètres apparaît dans l'interface représentée sur la Figure 54.

Pour l'environnement, les paramètres sont :

- le nombre d'analyses du milieu de l'environnement par semaine en régime standard  $NbAnaE$
- la sensibilité  $Se$  et la spécificité  $Sp$  du test utilisé
- la surface totale de la zone d'affinage  $Stot$
- la surface moyenne frottée pour une analyse  $Sana$
- le type de plan de contrôle  $TypePC$
- le nombre d'analyses supplémentaires par semaine en régime renforcé  $AnaEnvSupp$

Pour les produits, les paramètres sont :

- le nombre de fromages analysés par lot en régime standard  $Nbprod$
- le nombre d'analyses supplémentaires en régime renforcé  $AnaProdSupp$

The screenshot shows a software window titled 'analyses' with a blue border and standard Windows window controls. The interface is divided into two main sections: 'ENVIRONNEMENT' on the left and 'FROMAGES' on the right. Each section contains several parameters with corresponding input fields. A 'Sauvegarder' (Save) button is located in the lower right area of the window.

ENVIRONNEMENT		FROMAGES	
Nombre d'analyses par semaine *	25	Nombre de fromages analysés par lot	5
Sensibilité du test	0.98	Nombre d'analyses supplémentaires en plan renforcé	3
Spécificité du test	1		
Surface totale de la zone d'affinage	2000		
Surface moyenne d'un frottis	0.003		
Type de plan de controle	1		
Nombres d'analyses supplémentaires si analyse positive	5		

**Sauvegarder**

**Figure 54 Interface n°3 regroupant les paramètres des mesures de maîtrise**

### III. Application

L'objectif de ce chapitre est d'illustrer les différents types de résultats et de mettre en évidence les intérêts d'un tel modèle en termes de maîtrise du risque. Un scénario de référence est considéré, pour lequel des résultats graphiques sont présentés. L'impact de variations autour de ce scénario de référence est mesuré à travers des tableaux et graphiques comparatifs.

#### A. Scénarios simulés

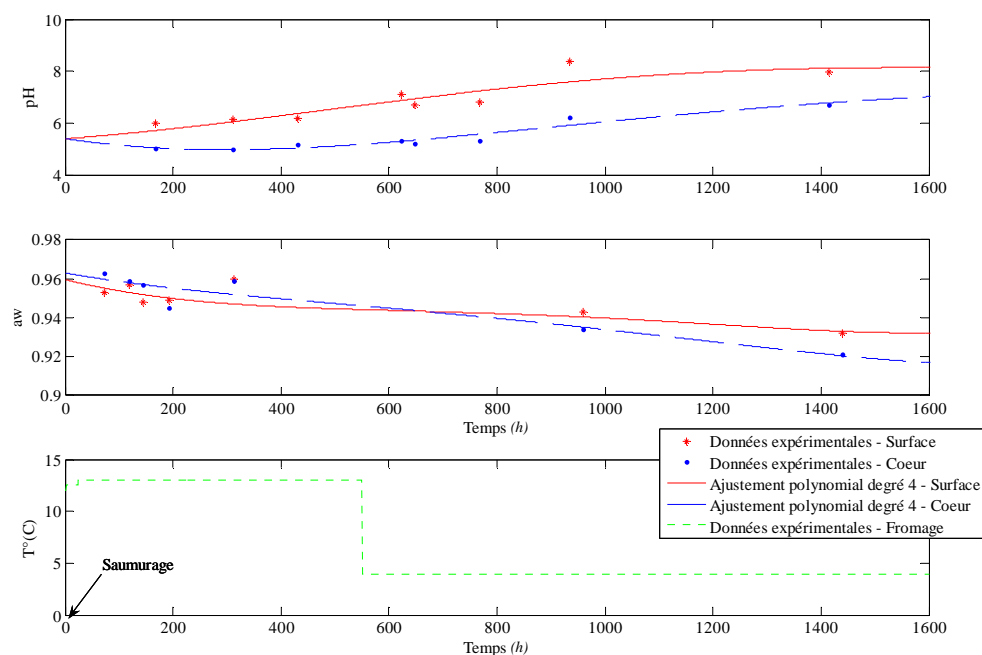
##### 1) Scénario de référence

Dans ce paragraphe nous explicitons les valeurs des paramètres utilisées pour le scénario de référence. Les valeurs associées à chaque paramètre sont reportées dans les interfaces présentées dans la Figure 52, la Figure 53 et la Figure 54.

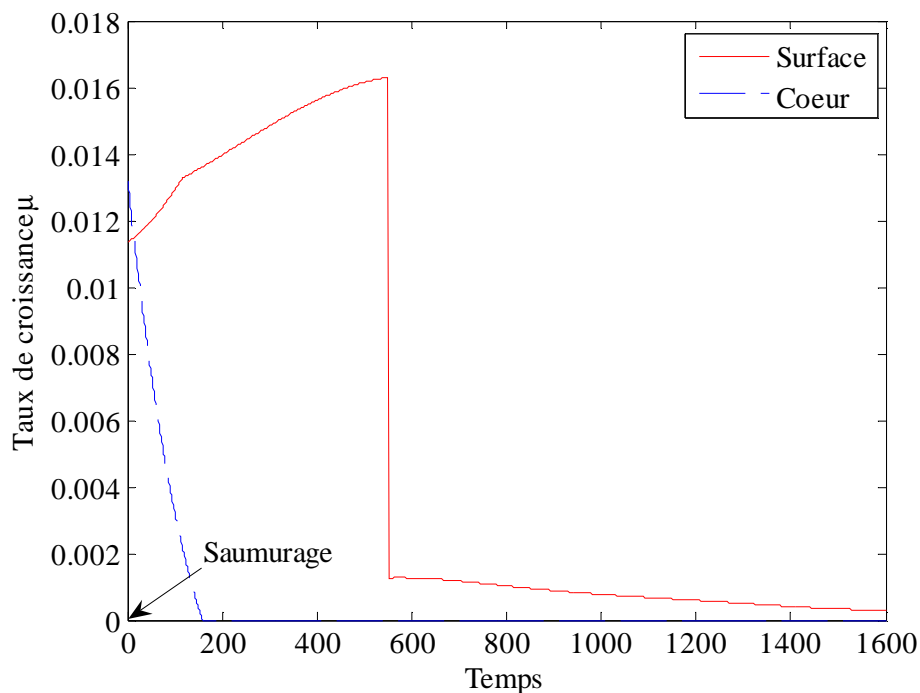
Pour des raisons de temps de calcul, seulement 20 itérations d'un même scénario sont effectuées, évaluant les conséquences d'une primo-contamination sur 200 jours. Ce scénario de primo-contamination ne concerne que le milieu de l'environnement d'affinage, contaminé avec 2000 cellules isolées.



Les valeurs des paramètres relatives au procédé de fabrication sont basées sur celui d'un fromage à pâte molle, au lait pasteurisé et à croûte lavée. Les valeurs des paramètres du polynôme de degré 4 modélisant l'évolution du pH et de l'activité de l'eau dans le produit au cours du temps, depuis le saumurage jusqu'à la DLUO, proviennent d'un ajustement sur des données industrielles réelles issues de ce même procédé, pour le cœur et la surface respectivement (Figure 55). A partir de ces valeurs, le taux de croissance instantané a pu être calculé à chaque heure du procédé à partir de l'Équation 3 (Figure 56).



**Figure 55 Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de la vie du produit (DLUO = 1600 heures)**



**Figure 56 Evolution du taux de croissance au cours de la vie du produit (DLUO = 1600 heures)**

Les valeurs des paramètres relatives aux mesures de maîtrise en régimes standard et renforcé sont issues de cette même usine. Celles concernant l'efficacité des mesures d'hygiène s'inspirent de la revue bibliographique du Chapitre III. Les valeurs des paramètres concernant la croissance des colonies sont issues de la bibliographie sur la croissance du Chapitre III et d'avis d'experts. La valeur du temps de duplication des cellules dans l'environnement d'affinage est issue d'avis d'expert (Mettler, E., communication personnelle).

Celles concernant le transfert sont aussi issues d'avis d'experts. Par exemple, si la probabilité de contact entre un produit et une colonie ( $P_{cont}$ ) est  $10^{-6}$ , alors le pourcentage de colonies recontaminantes au passage de 5000 produits est 0,5%. Ainsi si 200 colonies sont potentiellement recontaminantes, un seul fromage sur 5000 est contaminé. Une étude étudiant l'impact des contaminations secondaires sur le niveau de contamination de saumons par *L. monocytogenes* estimait la valeur de ce paramètre à  $8,01 \cdot 10^{-6}$  (Ivanek et al., 2004).

Les valeurs de la quantité de travail à accomplir par les cellules de l'environnement de la zone d'affinage ne figurent pas sur l'interface mais directement dans le programme-source. Cette quantité de travail est fixée à 1. Elle correspond, pour une cellule présente dans le milieu de l'environnement d'affinage pour lequel le taux de croissance de *L. monocytogenes* est  $0,03 \text{ h}^{-1}$  ( $= \ln(2)/24$ ), à un temps de reprise de croissance d'environ 33 heures.

## 2) Variations autour du scénario de référence

Afin d'évaluer l'impact des différents phénomènes et de la valeur des paramètres sur les résultats, nous avons apporté des variations aux paramètres du scénario de référence. Ces scénarios sont numérotés de 1 à 21. Pour chacun, tous les paramètres, sauf un, sont identiques à ceux du scénario de référence (Tableau 30).

**Tableau 30 Variation autour du scénario de référence**

Type de variation	N° du scénario	Paramètre modifié	Valeur initiale	Valeur finale
Primo-contamination en phase d'affinage	1	$NbCell_{Milieu\_affinage}$	2000	500
	2	$NbCell_{Milieu\_affinage}$	2000	5000
	3	$NbCell_{machine\_soins}$	0	500
		$NbCell_{Milieu\_affinage}$	2000	0
Primo-contamination en phase de fabrication	4	$Recont_3$	0	1
		$C'(E_3)$	-	10 cellules par produit
		$I'(E_3)$	-	Tous les 10 fromages parmi les 100 premiers fabriqués
		$I_J$	-	Tous les 3 jours
		$Q(E_3)$	-	Calculé en fonction du protocole « Opération d'hygiène »
		$Recont_6$	0	1
	5	$C'(E_6)$	-	10 cellules par produit
		$I'(E_6)$	-	Tous les 10 fromages parmi les 100 premiers fabriqués
		$I_J$	-	Tous les 3 jours
		$Q(E_6)$	-	Calculé en fonction du protocole P4
		$Recont_2$	0	1
	6	$C(E_2)$	-	5 UFC/L
		$I(E_2)$	-	Tous les 10 fromages parmi les 100 premiers fabriqués
		$I_J$	-	Tous les 3 jours
		$Q(E_2)$	-	Calculé en fonction du type de stress « Opération d'hygiène »
Mesures de maîtrise	7	$RDSupp$	1	2
	8	$NbAnaE$	25	35
		$Nbprod$	5	8
	9	$TypePC$	1	2
	10	$NDMES$	8500	7000
	11	$eff_{milieu\_affinage}$	2	1
	12	$NDHa$	50	40
	13	$eff_{machine}$	3	2

	14	$NbAnaE$	25	15
		$Nbprod$	5	3
Transfert	15	$p_{cont}$	0,000001	0,00001
	16	$p_{sh}$	0,05	0,15
	17	$p_{détach}$	0,2	0,5
Croissance	18	$p_{crois}$	0,7	0,3
	19	$\mu_{opt}$	0,21	0,8
	20	$X_{max}$	$10^5$	$10^7$
	21	$T_g$	24	48

## B. Résultats

### 1) Evolution de la contamination au cours du temps

#### a. Exemples de résultats pour une itération du scénario de référence

Les résultats reportés dans cette section correspondent à une itération prise au hasard du scénario de référence. On observe la variation au cours du temps des niveaux de contamination et des probabilités de détection relatifs aux produits et à l'environnement.

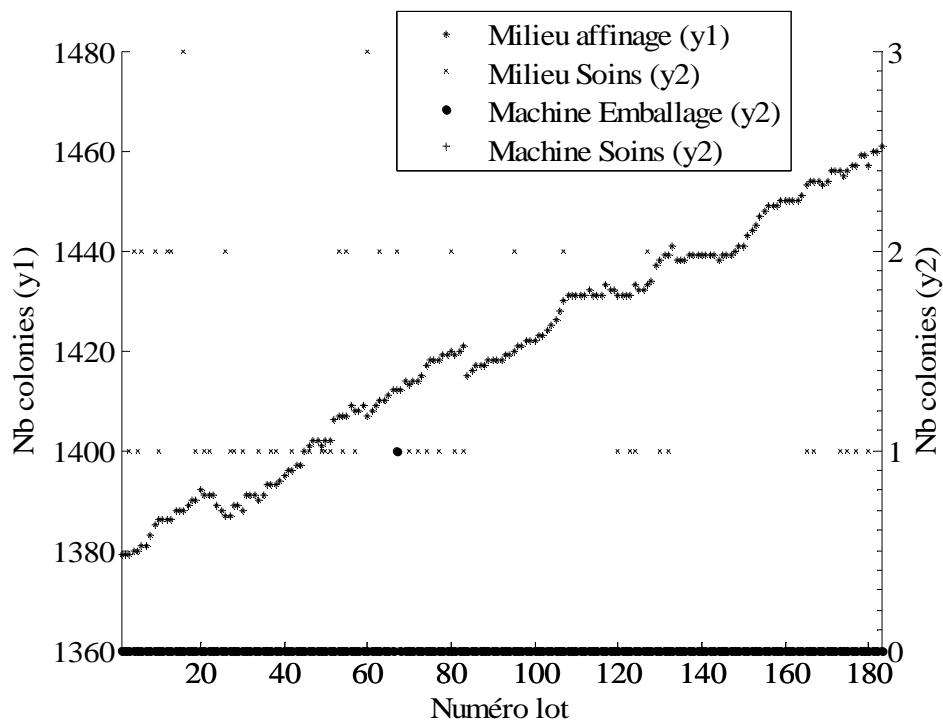


Figure 57 Niveau de contamination de l'environnement de la zone affinage en nombre de colonies

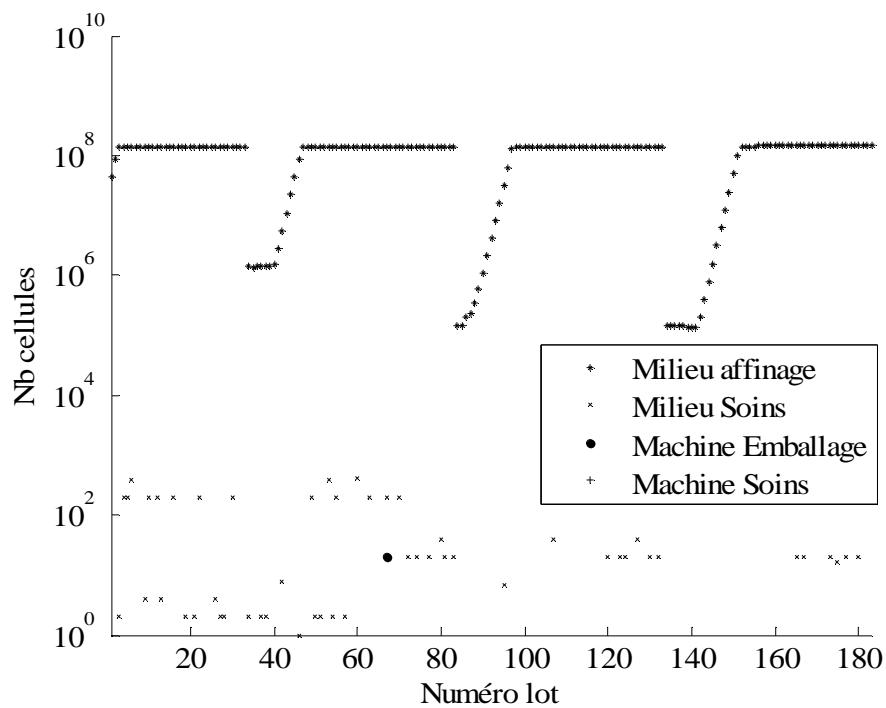


Figure 58 Niveau de contamination de l'environnement de la zone affinage en nombre de cellules

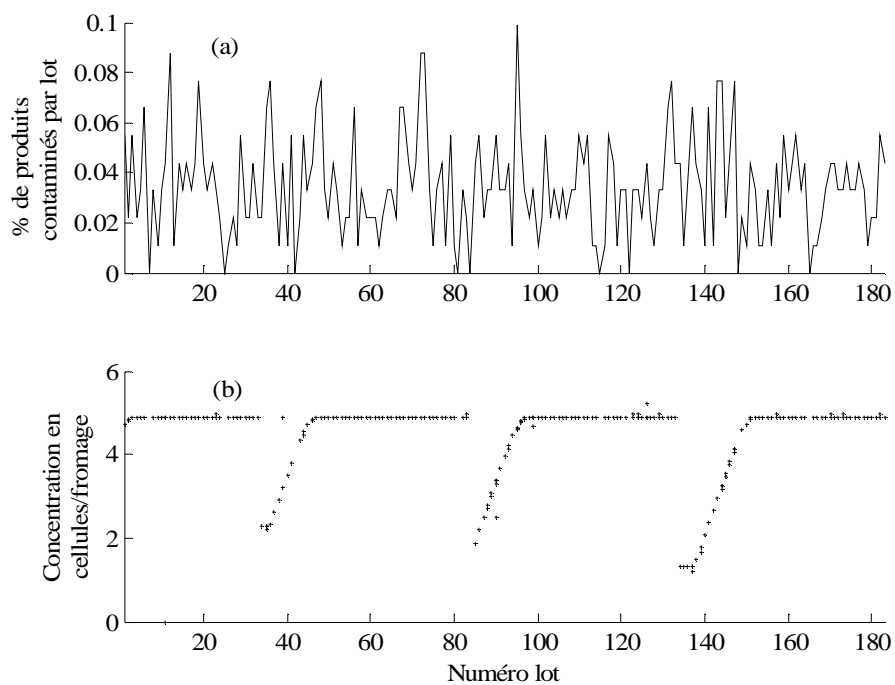
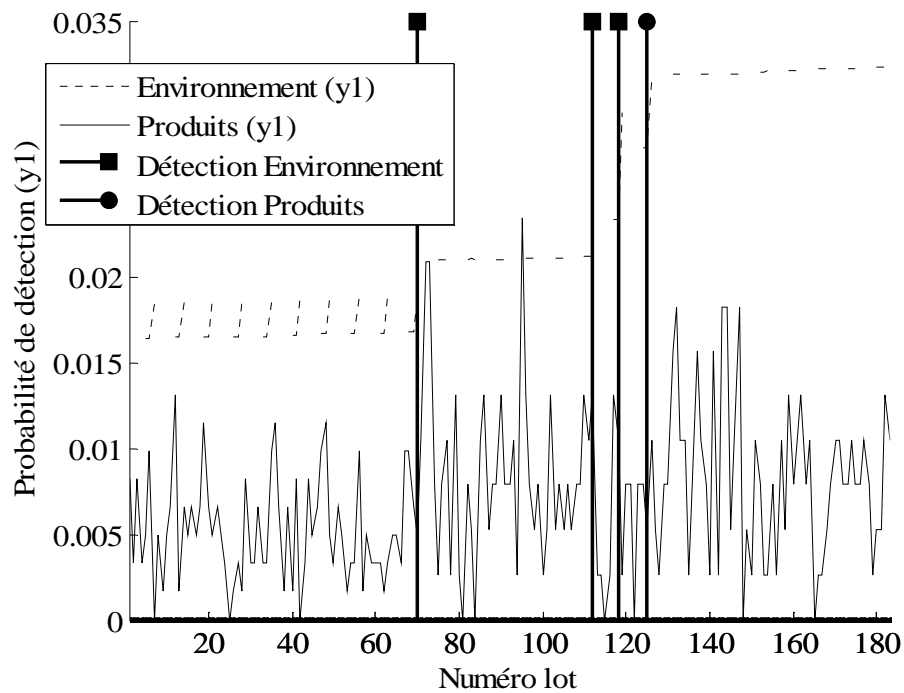
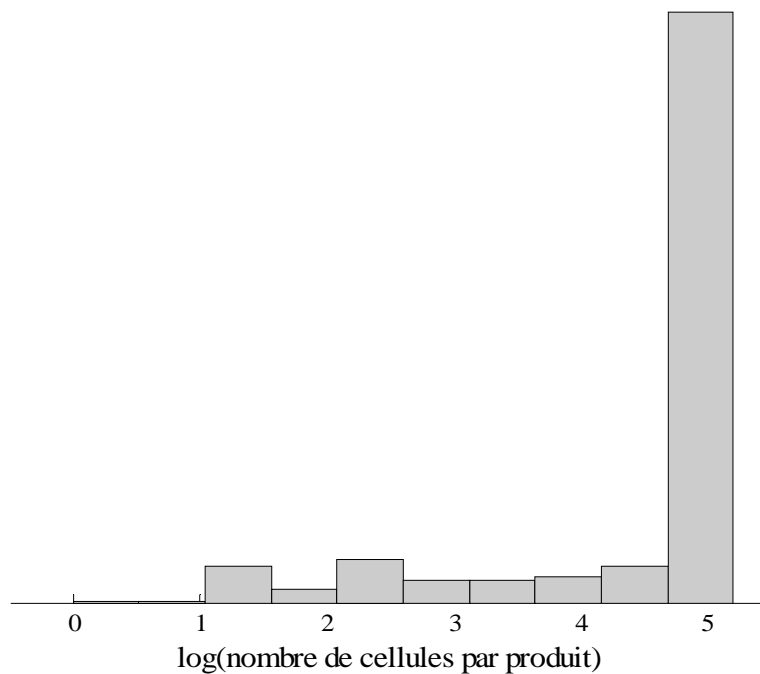


Figure 59 (a) Pourcentage de produits contaminés ; (b) Concentration des produits contaminés en nombre de cellules par produit



**Figure 60** Probabilité de détection d'une contamination dans l'environnement et dans les produits. Les barres verticales, représentent les jours pour lesquels une contamination a été détectée dans l'environnement et/ou dans les produits



**Figure 61** Histogramme des concentrations des produits contaminés en nombre de cellules par produit sur les 200 jours de l'itération.

Le nombre de colonies dans le milieu de l'environnement d'affinage est en constante augmentation (Figure 57), mais sa contamination reste pourtant difficilement détectable (Figure 60), malgré le plan de contrôle renforcé, mis en place dès qu'une contamination dans l'environnement ou dans un produit est détectée.

Ces plans de contrôle impliquent une augmentation des probabilités de détection pour l'environnement et les produits, mais n'impliquent pas une augmentation significative du nombre de détections (Figure 59) Ils impliquent aussi une plus grande diminution du nombre de cellules dans l'environnement, du fait de l'augmentation du nombre de réductions décimales en régime renforcé.

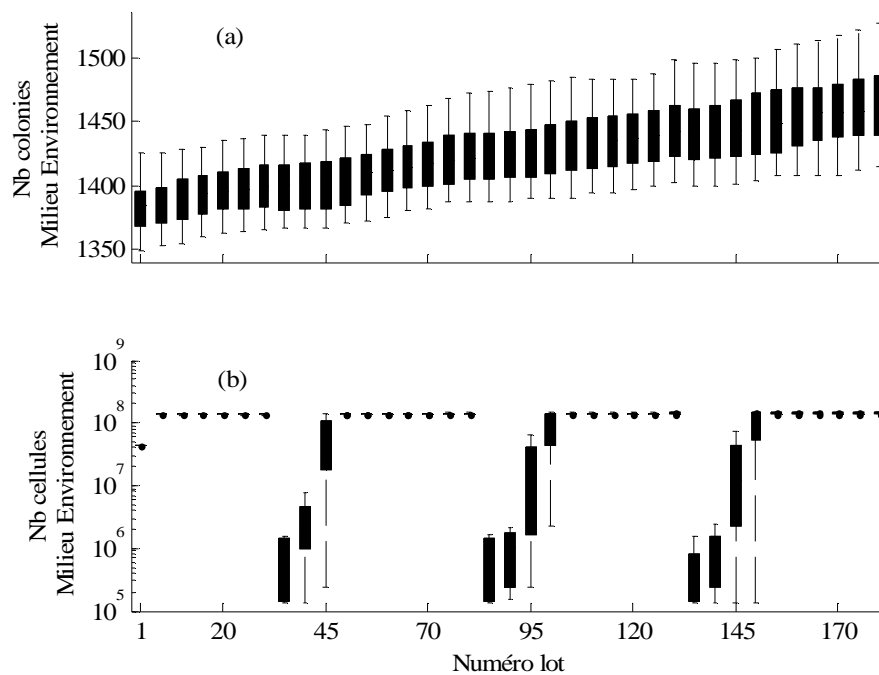
Le nombre de cellules dans cette même zone varie fortement du fait de la croissance des cellules et des opérations d'hygiène intervenant tous les 50 jours (Figure 58). Alors que le pourcentage de produits contaminés reste relativement stable avec une faible valeur (Figure 59.a), la concentration des produits contaminés dépend directement de la valeur du nombre de cellules dans l'environnement (Figure 59.b).

Concernant la contamination des zones de l'environnement autre que le milieu de l'environnement d'affinage, on observe que le nombre de colonies présentes sur les machines d'emballage et de soins est inférieur à 5 (Figure 57) et leur taille est généralement inférieure à 1000 cellules (Figure 58). Ces contaminations restent donc sporadiques et ne semblent pas avoir d'impact significatif sur le niveau de contamination des produits.

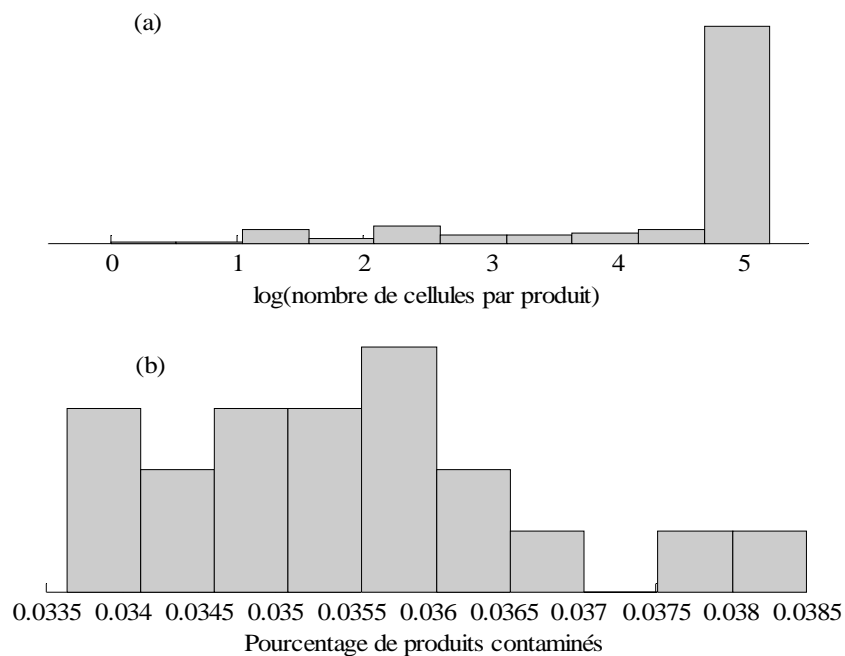
Pour les 200 jours de simulation, la prévalence moyenne des produits contaminés est faible, de l'ordre de 0,04%. De plus, une grande majorité de produits le sont avec une seule colonie de bactéries. La Figure 61 montre que le plus grand nombre de ces colonies ont atteint leur taille maximale, probablement suite à leur croissance sur le produit.

#### b. Variabilité inter-itération

Nous observons ici des résultats relatifs à la variabilité et l'incertitude induites par plusieurs itérations du scénario de référence.



**Figure 62 Variabilité du niveau de contamination de l'environnement de la zone affinage en nombre de colonies (a) et en nombre de cellules (b) pour 20 itérations d'un même scénario.**



**Figure 63 (a) Distribution de la concentration des produits contaminés en nombre de cellules par produit sur 200 jours et pour 20 itérations cumulées (b) Distribution du pourcentage de produits contaminés sur 200 jours pour 20 itérations.**



Ces graphiques montrent que la variabilité induite par certaines fonctions du modèle et certaines distributions de paramètres ont peu d'influence sur la variabilité des résultats : l'évolution du nombre de cellules et de colonies dans l'environnement est similaire d'une itération à l'autre (Figure 62), l'histogramme des concentrations des produits contaminés en nombre de cellules par produit pour les 200 jours de 20 itérations (Figure 63) conserve la même allure que dans le cas d'une seule itération et, enfin, le pourcentage de produits contaminés sur 200 jours présente une faible variance.

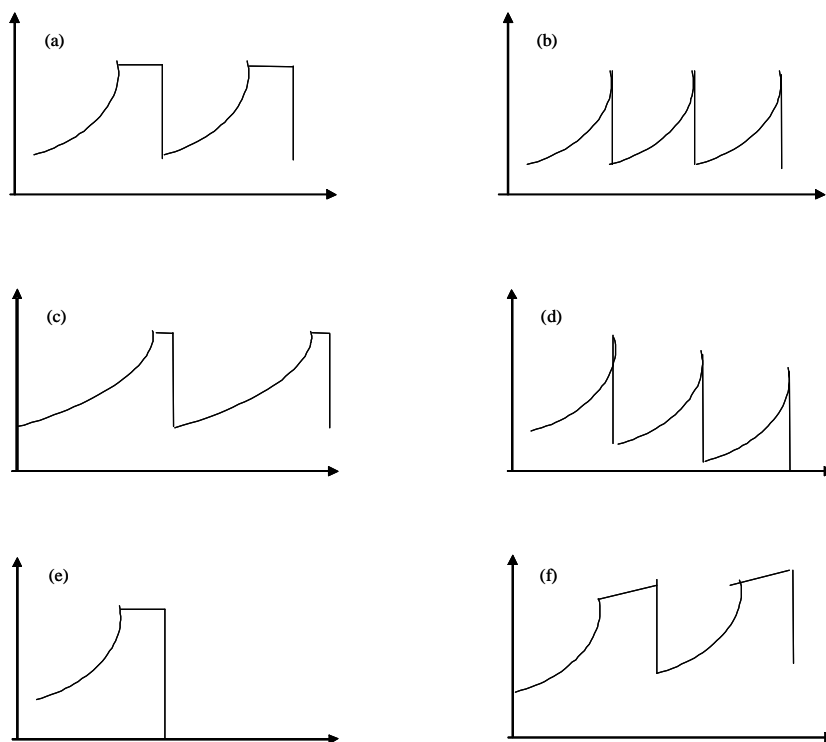
On constate donc une certaine robustesse du modèle, c'est-à-dire, sa capacité à se comporter de la même façon lorsque ses paramètres sont légèrement modifiés et lorsque l'on tient compte de phénomènes aléatoires.

### c. Généralisation des conséquences d'une primo-contamination

Les résultats présentés ci-dessus laissent entrevoir que le nombre de cellules dans l'environnement, variable ayant le plus d'influence sur le niveau de contamination des produits, dépend principalement de la combinaison de trois paramètres principaux : le taux de croissance des cellules dans l'environnement (représenté par  $Tg$ ), l'efficacité des opérations d'hygiène dans l'environnement d'affinage (représenté par  $eff_{milieu\_affinage}$ ) et la période entre deux opérations d'hygiène dans l'environnement d'affinage (représenté par  $NDHa$ ).

Les schémas de la Figure 64 illustrent quelques cas de figures possibles pour l'évolution du nombre de cellules dans l'environnement d'affinage.

Le schéma (a) représente l'évolution du nombre de cellules dans l'environnement, pour le scénario de référence. Pour ce type de scénario,  $Tg$  et  $NDHa$  sont suffisamment grands pour que chaque colonie atteigne sa taille maximale après  $eff_{milieu\_affinage}$  réductions décimales. Ici,  $eff_{milieu\_affinage}$  ne permet pas l'inactivation de toutes les cellules d'une colonie.



**Figure 64** Cas possibles d'évolution du nombre de cellules dans l'environnement en fonction des variables  $\mu$ , POH et RD. L'axe des abscisses représente le temps en jours et l'axe des ordonnées, le nombre de cellules dans le milieu de l'environnement sur une échelle logarithmique.

Les variations autour de ce type de comportement sont les suivantes :

- Le schéma (b) correspond au cas où le taux de croissance n'est pas suffisamment grand pour que les colonies atteignent leur taille maximale entre deux opérations d'hygiène.
- Le schéma (c) correspond au cas où le taux de réduction induit une croissance plus lente et où les périodes lavage sont plus élevées que POH en nombre de jours.
- Le schéma (d) représente le cas où le taux de croissance est trop faible pour permettre à une colonie d'atteindre sa taille maximale entre deux opérations d'hygiène. De plus le nombre de réductions décimales permet la destruction d'un nombre de cellules plus élevé que celui généré entre deux opérations d'hygiène.
- Le schéma (e) représente le cas où le nombre de réductions décimales permet l'inactivation de toutes les cellules d'une colonie ayant atteint sa taille maximale.
- Le schéma (f) représente le cas où le nombre de cellules augmente significativement dans l'environnement. Lorsque le taux de croissance est faible, ce cas est difficilement observable. Par contre, il s'avère possible lorsque que l'environnement d'affinage est quotidiennement approvisionné en colonies. C'est par exemple le cas lorsqu'un réservoir sur une machine n'est pas détecté, contamine des unités de production, qui contaminent à leur tour l'environnement d'affinage.

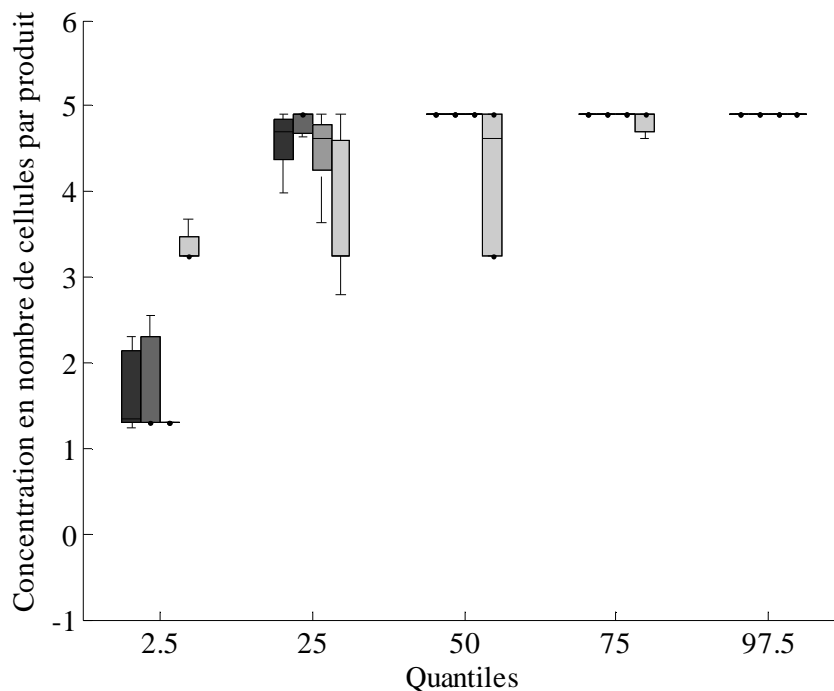
## 2) Mise en évidence des leviers de maîtrise du risque

Dans ce paragraphe, nous illustrons, par des exemples concrets, l'impact d'une variation du scénario de référence sur la distribution de la concentration des produits contaminés et sur la prévalence des produits contaminés sur 200 jours consécutifs, et enfin sur le risque de listériose encouru par le consommateur. Ces résultats mettent en évidence les leviers de maîtrise majeurs permettant de faire diminuer ce risque.

### a. Impact d'une variation du scénario de référence sur la distribution de la concentration des produits contaminés

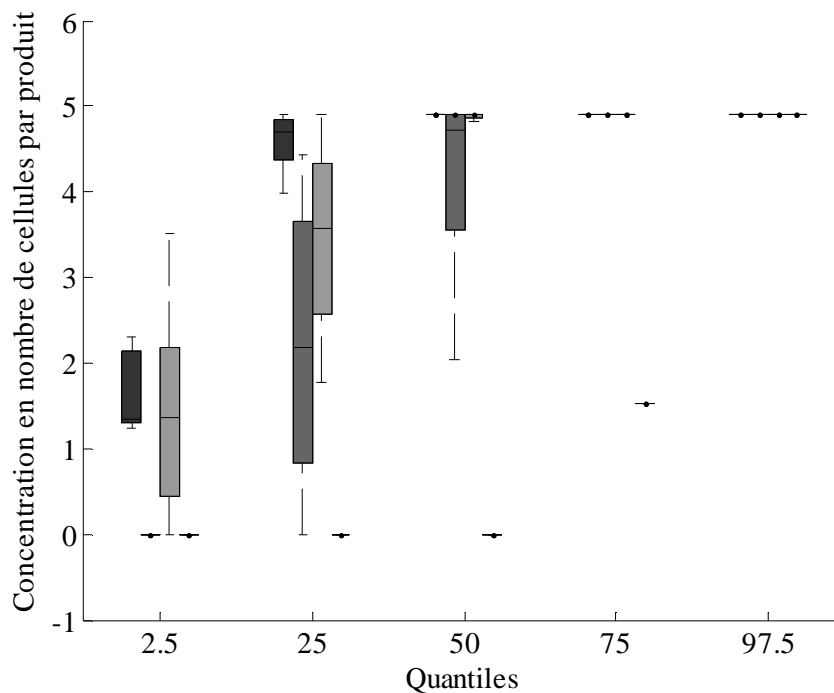
Considérons, pour chaque itération d'un scénario donné, la distribution de la concentration des produits contaminés sur les 200 jours consécutifs, plus particulièrement les 2,5<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup>, 50<sup>ème</sup>, 75<sup>ème</sup>, et 97,5<sup>ème</sup> quantiles de cette distribution. Pour chaque scénario et chaque quantile, 20 valeurs sont observées, correspondant aux 20 itérations mises en œuvre par scénario. Sur les figures suivantes (chaque figure correspondant à un type de variation par rapport au scénario de référence), sont représentés, sous forme de boîtes à moustaches, ces 20 valeurs.

De manière générale et pour la majorité des scénarios, seuls les quantiles strictement inférieurs à 50% présentent une variabilité, les autres étant tous égaux à environ  $10^5$  CFU/produit. Ainsi, au moins la moitié des produits contaminés le sont avec  $10^5$  cellules par produit, ce qui correspond à la taille maximale d'une colonie, et ce, quelque soit le scénario. L'impact d'une variation d'un paramètre du scénario de référence sur le niveau de concentration des produits contaminés concerne donc moins de la moitié des produits contaminés. De plus, les valeurs moyennes des quantiles inférieurs à 50% ont le même ordre de grandeur pour la majorité des scénarios, sur une échelle logarithmique.



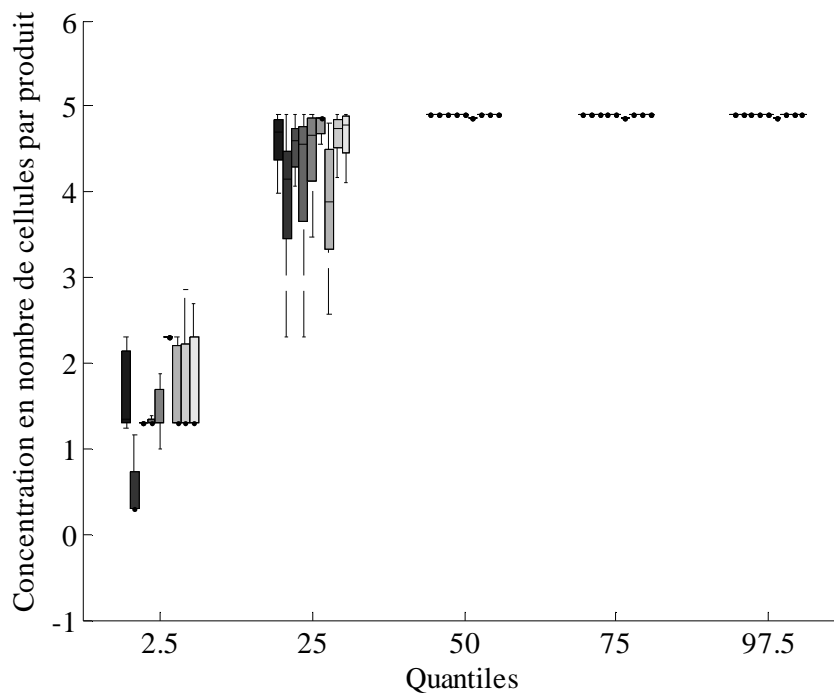
**Figure 65 Comparaison de la distribution des concentrations des produits contaminés pour les scénarios dont le type de variation concerne la primo-contamination en phase d’affinage. Du plus foncé au plus clair sont représentés les résultats du scénario de référence et des scénarios 1, 2 et 3.**

Plus le nombre de colonies dans le milieu de l’environnement d’affinage est important (scénario 2), plus la moyenne du 2,5<sup>ème</sup> et du 25<sup>ème</sup> percentile diminuent. En effet, l’augmentation du nombre de colonie dans l’environnement engendre plus de possibilités en termes de transfert ou de croissance. Ainsi, l’étendue des concentrations des produits contaminés est plus grande pour les primo-contaminations importantes. La présence d’une concentration maximale et d’une concentration minimale, égales à  $10^5$  et  $10^{1,3}$  cellules par produit respectivement, implique que les faibles concentrations du 2,5<sup>ème</sup> percentile et les fortes concentrations du 25<sup>ème</sup> percentile ne sont pas observées (Figure 65). Il est donc difficile de conclure quant à l’influence du nombre de colonies dans l’environnement sur la variance des percentiles. Lorsque la machine de soins est contaminée (scénario 3), la concentration minimale des produits contaminés est d’environ  $10^3$  cellules par produits, plus élevée que pour les autres scénarios de primo-contamination.



**Figure 66 Comparaison de la distribution des concentrations des produits contaminés pour les scénarios dont le type de variation concerne la primo-contamination en phase de fabrication. Du plus foncé au plus clair sont représentés les résultats du scénario de référence et des scénarios 4, 5 et 6.**

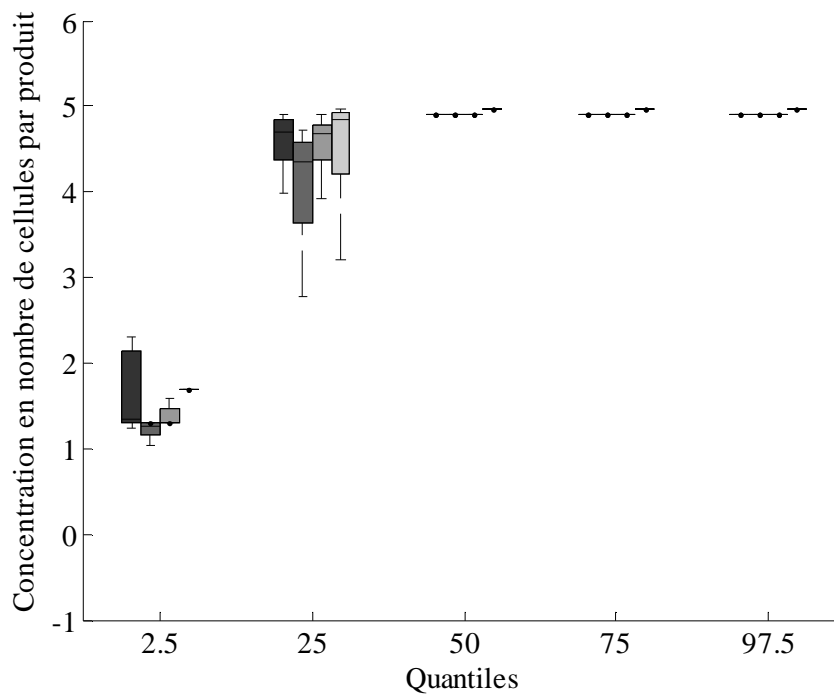
De manière générale, lorsque la primo-contamination se produit en fabrication, un jour sur 3, la moyenne d'un quantile est toujours inférieure ou égale à celle du quantile équivalent pour le scénario de référence (Figure 66). D'autre part, ces moyennes sont plus élevées pour une primo-contamination au saumurage (scénario 5) qu'à l'égouttage (scénario 4). Cette différence peut être attribuée à la différence des quantités de travail des cellules recontaminantes : les temps de reprise de croissance sont plus élevés pour l'égouttage que pour le saumurage. Enfin, une primo-contamination au post-emprésurage (scénario 6) implique des produits contaminés avec une très faible concentration : 50% des produits contiennent une seule cellule. Ceci est dû à un taux de croissance très faible à cœur et au fait qu'une faible proportion de cellules ayant contaminé le lait des bassines sont transférées à la surface du produit.



**Figure 67 Comparaison de la distribution des concentrations des produits contaminés pour les scénarios dont le type de variation concerne les mesures de maîtrise. Du plus foncé au plus clair sont représentés les résultats du scénario de référence et des scénarios 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.**

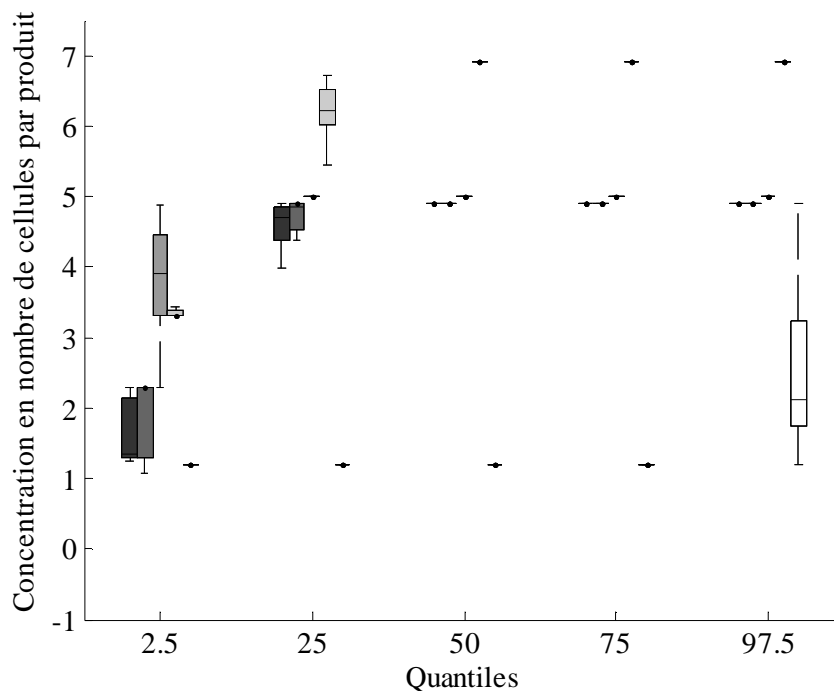
Il semble que la variation des paramètres de mesures de maîtrise ait un impact modéré sur la distribution de concentration des produits contaminés (Figure 67). En effet, pour le scénario de référence et les scénarios 8, 9, 10, 13 et 14, les moyennes des 2,5<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> percentiles sont quasiment similaire d'un scénario à l'autre ; Seule l'étendue et la forme de la distribution des percentiles varient d'un scénario à l'autre. Trois scénarios se démarquent cependant :

- I. les scénarios 7 et 12 pour lequel les produits les plus faiblement contaminés le sont avec des concentrations plus faibles que pour les autres scénarios
- II. le scénario 11, pour lequel les produits les plus faiblement contaminés le sont avec des concentrations plus élevées que pour les autres scénarios.



**Figure 68 Comparaison de la distribution des concentrations des produits contaminés pour les scénarios dont le type de variation concerne les paramètres de transfert. Du plus foncé au plus clair sont représentés les résultats du scénario de référence et des scénarios 15, 16 et 17.**

Les différences entre les distributions de concentration ne semblent pas marquées d'avantage lorsque les paramètres de transfert du modèle varient (Figure 68). Ainsi, les moyennes des 5<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> percentiles restent relativement constantes d'un scénario à l'autre : entre 10 et 100 cellules par produit pour le 5<sup>ème</sup> percentile et entre 1000 et 10000 cellules par produit pour le 25<sup>ème</sup> percentile.



**Figure 69 Comparaison de la distribution des concentrations des produits contaminés pour les scénarios dont le type de variation concerne les paramètres de croissance. Du plus foncé au plus clair sont représentés les résultats du scénario de référence et des scénarios 18, 19, 20 et 21**

L'influence d'une variation des paramètres de croissance sur la distribution de la concentration des produits contaminés est plus grande que pour d'autres types de variations. Notamment, pour le scénario 19, on observe une plus grande proportion de produits contaminés (au mois 75%) avec une colonie ayant atteint sa taille maximale. De même pour le scénario 20, on observe que la moyenne des quantiles est plus élevée que pour le scénario de référence, les colonies ayant une taille maximale plus élevée. Enfin, le scénario 21 se démarque par un 97,5<sup>ème</sup> percentile de moyenne environ 2 log (faible niveau de contamination des produits pour ce scénario).

Ces résultats sur la distribution de la concentration des produits contaminés sont à coupler aux résultats concernant la prévalence des lots. En effet, ces deux valeurs sont complémentaires pour évaluer le risque de listériose encouru par le consommateur.

## b. Prévalence

Pour une itération d'un scénario donné, considérons le nombre total de produits fabriqués et le nombre total de produits contaminés sur 200 jours. La distribution du pourcentage de produits contaminés sur cette période, issue des 20 itérations du même scénario, est reportée dans le Tableau 31 à travers les 2,5<sup>ème</sup>, 25<sup>ème</sup>,



50<sup>ème</sup>, 75<sup>ème</sup> et 97,5<sup>ème</sup> percentiles. Dans ce cadre, on cherche à comparer l'impact d'un changement du scénario sur les différents percentiles de cette distribution

**Tableau 31 Distribution de la prévalence sur 200 jours pour 20 itérations de chaque scénario**

Types de variation	N° du scénario	Distribution de la prévalence				
		2,5%	25%	50%	75%	97,5%
-	Référence	0,0336	0,0346	0,0354	0,0361	0,0385
Primo-contamination en phase d'affinage	1****	0,0868	0,0892	0,0914	0,0933	0,0951
	2****	0,0080	0,0085	0,0090	0,0100	0,0109
	3****	0,0001	0,0001	0,0002	0,0002	0,0004
Primo-contamination en phase de fabrication	4****	0,0004	0,0005	0,0006	0,0009	0,0012
	5****	0,0005	0,0008	0,0010	0,0013	0,0014
	6****	1,0579	1,0630	1,0644	1,0657	1,0734
Mesures de maîtrise	7	0,0329	0,0351	0,0365	0,0376	0,0385
	8	0,0346	0,0354	0,0359	0,0369	0,0397
	9****	0,0345	0,0350	0,0371	0,0384	0,0395
	10****	0,0218	0,0358	0,0364	0,0377	0,0395
	11****	0,0341	0,0357	0,0373	0,0378	0,0392
	12	0,0329	0,0347	0,0361	0,0375	0,0404
	13	0,0342	0,0348	0,0355	0,0366	0,0378
	14**	0,0328	0,0354	0,0365	0,0377	0,0402
Transfert	15****	0,3793	0,3947	0,3985	0,4106	0,4224
	16****	0,0346	0,0376	0,0387	0,0396	0,0410
	17****	0,0325	0,0362	0,0374	0,0381	0,0390
Croissance	18****	0,0182	0,0201	0,0213	0,0222	0,0229
	19****	0,0322	0,0357	0,0366	0,0368	0,0384
	20	0,0328	0,0351	0,0362	0,0379	0,0397
	21****	0,0037	0,0040	0,0045	0,0047	0,0056

\* L'hypothèse « les observations issues de ce scénario et celles issues du scénario de référence proviennent d'une même distribution continue » peut être rejetée au risque  $\alpha = 5\%$  avec le test de Kolmogorov-Smirnov

\*\* L'hypothèse d'égalité des médianes du scénario considérée et du scénario de référence peut être rejetée au risque  $\alpha = 5\%$  avec le test des rangs de Wilcoxon

Les tests de Kolmogorov Smirnov et de Wilcoxon, testant respectivement l'égalité des distributions annuelles de la prévalence entre un scénario donné et le scénario de référence et l'égalité de leur médiane, ont été utilisés. Le Tableau 31 fournit les résultats de ces tests et indique que, quelque soit le test, l'hypothèse nulle est rejetée pour les scénarios 1, 2, 3, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19 et 21.

Quelques scénarios semblent se démarquer plus particulièrement du scénario de référence : les quantiles de la distribution de prévalence du scénario 15 sont environ dix fois plus grands que ceux du scénario de référence, à l'inverse de ceux du scénario 21 qui le sont environ dix fois moins. Ceux du scénario 18, pour leur part, sont environ 2 fois moins élevés. Enfin, les quantiles des distributions de prévalence des scénarios 1 et 2 sont respectivement environ 3 fois plus petits et environ 3 fois plus grands, que ceux du scénario de référence. Enfin le scénario 3, pour lequel la primo-contamination se produit à partir de la machine de soins, présente des quantiles de 100 à 500 fois plus faibles.

Concernant les scénarios pour lesquels une primo-contamination se produit en phase de fabrication, on observe des quantiles 30 à 80 fois plus faible pour les scénarios 4 et 5 que pour le scénario de référence. Le

scénario 6, simulant une primo-contamination du lait des bassines, conduit à des quantiles 30 fois plus élevés, de l'ordre de 1% de produits contaminés.

#### c. Risque de listériose encouru par le consommateur

Soit  $r$ , le risque individuel moyen de tomber malade en ingérant une cellule de *L. monocytogenes*. Supposons que la valeur de  $r$  s'élève à  $10^{-12}$  (cet ordre de grandeur correspond plutôt à la population sensible) et que l'impact d'une cellule est indépendant de l'impact d'une autre cellule présente dans une même portion, selon l'hypothèse dite du « single hit » (Buchanan et al., 2000). Dans ce cadre, la probabilité de ne pas tomber malade en ingérant  $X$  cellules vaut  $(1-r)^X$ .

Soit une itération d'un scénario donné à laquelle est associée la prévalence des produits contaminés sur 200 jours,  $p_{200j}$ , et la concentration moyenne des produits contaminés sur les 200 jours,  $c_{200j}$  (en nombre de cellules par gramme). Les produits considérés sont supposés peser 200 grammes. Ces deux valeurs caractérisent le niveau de contamination moyen d'un produit issu de ces 200 jours de production.

Le risque  $r_{200j}$  pour un individu de tomber malade en ingérant  $P_{200j}$  portions de  $q$  grammes d'un produit ayant les caractéristiques de contamination ci-dessus, pendant 200 jours, est :

$$r_{200j} = 1 - (1-r)^X \text{ avec } X = p_{200j} \times P_{200j} \times c_{200j} \times q.$$

En effet,  $p_{200j} \times P_{200j}$  correspond au nombre de portions ingérées en 200 jours et  $c_{200j} \times q$  correspond au nombre de bactéries ingérées par portion. Pour des valeurs très petites de  $r$ ,  $(1-r)^X$  est approximé par  $e^{-rX}$  car  $\log(1-r)$  peut lui-même être approximé par  $-r$  quand  $r$  très petit. Ainsi, on obtient une approximation du risque  $r_{200j}$  donnée par :

$$r_{200j} = 1 - e^{-rX} \text{ avec } X = p_{200j} \times P_{200j} \times c_{200j} \times q.$$

Pour  $q = 25$  grammes ;  $P_{200j} = 100$ , on obtient pour chaque scénario trois séries de 20 valeurs, correspondant à la distribution de la concentration moyenne des produits contaminés sur les 200 jours, à la distribution de la prévalence moyenne sur 200 jours et à la distribution du risque  $r_{200j}$ . Le Tableau 32 répertorie la moyenne de ces trois séries. Le test de Kolmogorov Smirnov a été utilisé afin de tester l'égalité entre la distribution de  $r_{200j}$  d'un scénario et celle du scénario de référence. Le test de Wilcoxon nous a permis de tester également l'égalité des médianes de ces distributions.

**Tableau 32 Comparaison des scénarios quant au risque de listériose encouru par le consommateur**

Type de variation	N° du scénario	Moyenne de $C_{200j}$ (échelle logarithmique)	Moyenne de $p_{200j}$ (en pourcentage)	Moyenne de $r_{200j}$
-	Référence	2,4882	0,0355	2,7303e-010
Primo-contamination en phase d'affinage	1	2,5038	0,0092	7,3483e-011***
	2	2,481	0,0913	6,9037e-010***
	3	2,319	0,0002	7,7999e-013***
Primo-contamination en phase de fabrication	4	2,3237	0,0007	3,428 <sup>e</sup> -012***
	5	2,4224	0,001	6,6526e-012***
	6	1,1784	1,064	4,0148e-010***
Mesures de maîtrise	7	2,4605	0,0362	2,7098e-010**
	8	2,4776	0,0363	2,7278e-010
	9	2,4687	0,0368	2,7045e-010
	10	2,4756	0,0359	2,7014e-010
	11	2,4576	0,0369	2,6489e-010
	12	2,444	0,0363	2,5205e-010***
	13	2,4958	0,0357	2,796 <sup>e</sup> -010
	14	2,4923	0,0364	2,832 <sup>e</sup> -010
Transfert	15	2,4591	0,4014	2,8912e-09***
	16	2,4771	0,0384	2,8817e-010***
	17	2,5478	0,0370	3,2663e-010***
Croissance	18	2,4903	0,0211	1,63e-010***
	19	2,6672	0,0362	4,2121e-010***
	20	4,4616	0,0364	2,6403e-08***
	21	0,6714	0,0044	4,9966e-013***

\* L'hypothèse « les observations  $r_{200j}$  issues de ce scénario et celles issues du scénario de référence proviennent d'une même distribution continue » peut être rejetée au risque  $\alpha = 5\%$  avec le test de Kolmogorov-Smirnov

\*\* L'hypothèse d'égalité des médianes du scénario considérée et du scénario de référence peut être rejetée au risque  $\alpha = 5\%$  avec le test des rangs de Wilcoxon

Les niveaux de risque observés sont très faibles, de l'ordre de « un cas sur une dizaine de milliards », pour la majorité des scénarii. Les scénarii pour lesquels la distribution du risque est significativement différente de celle pour le scénario de référence sont, pour la majorité, ceux pour lesquels une différence significative, au sens statistique, pour la prévalence et/ou, au sens visuel, pour la distribution de la concentration, était observée.

Ce tableau permet de mettre en évidence et de classer les leviers de maîtrise du risque. De manière générale, la variation du niveau de risque lorsqu'un paramètre varie dépend de la variation de la prévalence des produits contaminés et/ou de leur concentration.

### 3) Le modèle en tant qu'outil de maîtrise des dangers microbiologiques

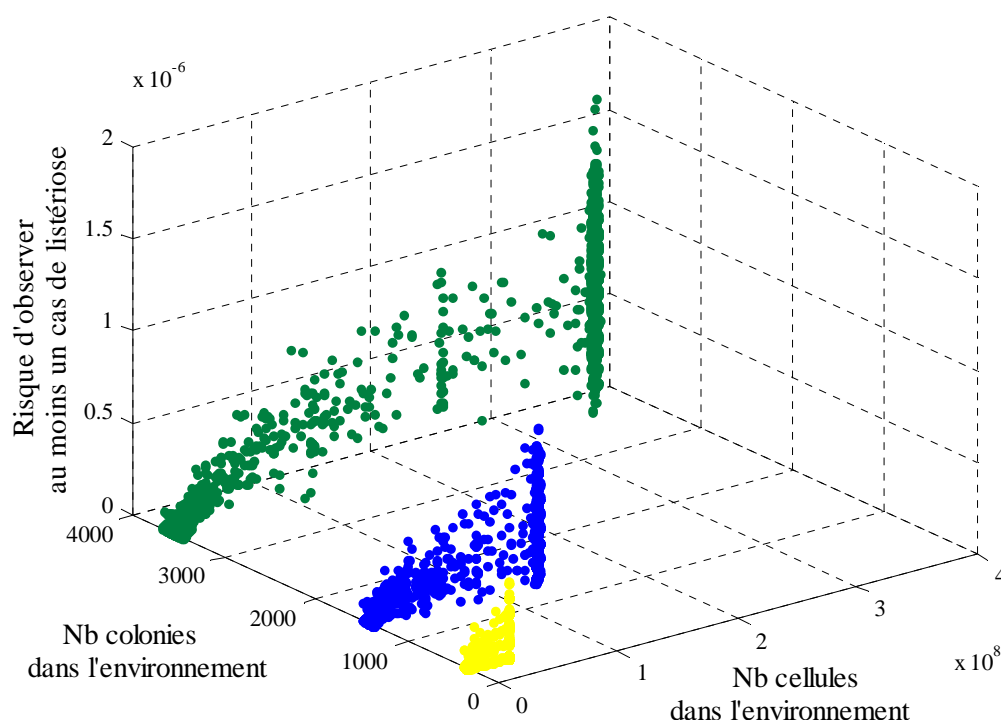
Dans cette section, nous cherchons à établir une relation entre le niveau de contamination de l'environnement de l'usine un jour donné et le risque d'observer au moins un cas de listériose pour chaque lot sortis de l'usine ce même jour. Nous exhibons également la non représentativité des plans de contrôle environnementaux par rapport à ce risque.

Le risque considéré est calculé comme suit : Soit l'ensemble des produits sortis d'usine un même jour donné et contenant au total  $N$  cellules. Alors, la probabilité d'observer au moins un cas de listériose est  $1 - e^{-Nr}$  (cf. paragraphe III.B.2.c de ce chapitre pour les détails du calcul).

a. Impact du niveau de contamination de l'environnement sur le risque d'observer au moins un cas de listériose pour un lot

La Figure 70 représente la probabilité d'observer au moins un cas de listériose pour les lots sortis d'usine la même journée en fonction du niveau de contamination de l'environnement ce jour, en nombre de colonies et en nombre de cellules. Toutes les observations journalières de chacune des 20 itérations sont représentées, avec une couleur par scénario. Les scénarios dont les observations sont représentées sont le scénario de référence (en bleu) et les scénarios dont les variations concernent la primo-contamination du milieu de la zone d'affinage (scénario 1 et 2, en jaune et en vert, respectivement).

Les résultats montrent que, pour les scénarii considérés, la moyenne du risque est dépendante du nombre de colonies et du nombre de cellules dans l'environnement, tandis que la variance de ce risque est principalement dépendante du nombre de cellules. Cette dernière observation provient du fait que ce risque est fonction du nombre total de cellules présentes dans les produits, lui-même fonction de la prévalence et de la concentration dans les produits. Or, pour les scénarii considérés, compte tenu de la faible augmentation quotidienne du nombre de colonies dans l'environnement, la distribution de la prévalence journalière présente une faible variance sur les 200 jours. De plus, la concentration moyenne des produits contaminés est, elle, directement liée au nombre de cellules du milieu de l'environnement, qui augmente linéairement sur une échelle logarithmique. Ainsi, pour une même distribution de prévalence, plus la concentration en cellules dans l'environnement est élevée sur une échelle logarithmique, plus la variabilité du nombre de cellules dans les produits est grande.

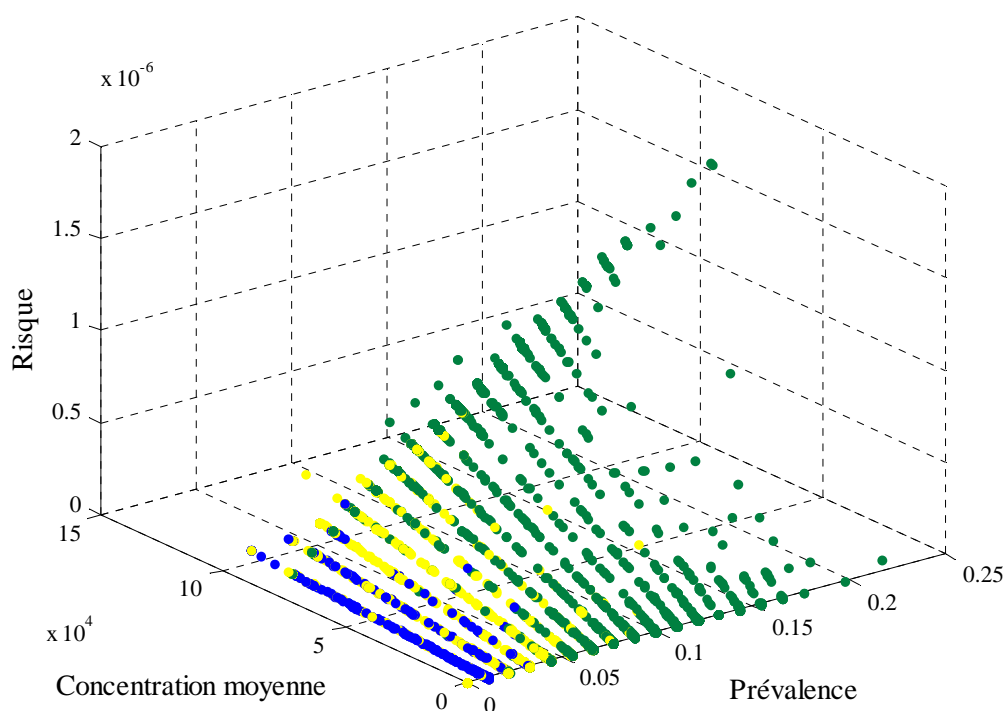


**Figure 70** Risque d’observer au moins un cas de listériose pour les lots sortis d’usine la même journée en fonction du niveau de contamination de l’environnement ce jour, en nombre de cellules et de colonies. Les observations bleu correspondent au scénario de référence et les observations jaunes (respectivement vertes) correspondent au scénario 1 (respectivement 2).

Les faibles valeurs du nombre de cellules dans l’environnement correspondent aux journées suivant les opérations d’hygiène dans le milieu de l’environnement, les valeurs intermédiaires correspondent aux journées pendant lesquelles les colonies de l’environnement croissent et les valeurs les plus élevés correspondent aux jours pendant lesquels leur taille maximale a été atteinte.

b. Risque d’observer au moins un cas de listériose pour un lot en fonction du niveau de contamination du lot

De la même manière que pour l’environnement, nous avons représenté sur la Figure 71 le risque quotidien associé à un ensemble de lots sortis d’usine le même jour, en fonction du niveau de contamination des produits de ces lots, exprimé avec la prévalence et la concentration moyenne des produits contaminés.

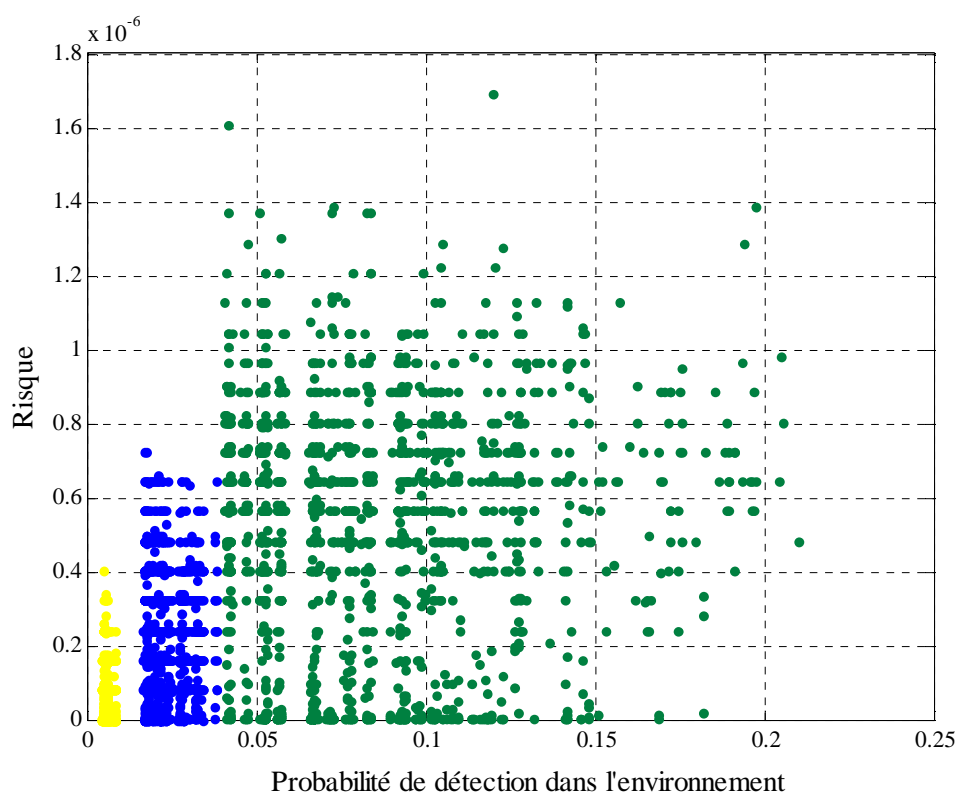


**Figure 71 Risque d’observer au moins un cas de listériose pour les lots sortis d’usine la même journée en fonction de la concentration moyenne des produits contaminés et leur prévalence. Les observations bleu correspondent au scénario de référence et les observations jaunes (respectivement vertes) correspondent au scénario 1 (respectivement 2).**

La Figure 71 montre que le niveau de risque dépend simultanément des deux variables considérées : prévalence et concentration moyenne des produits contaminés. Plus la prévalence augmente, plus la vitesse d’augmentation du risque en fonction de la concentration moyenne est grande. Le risque maximal et l’étendue du risque augmentent en fonction de la prévalence.

c. Artefact des résultats des plans de contrôle environnementaux par rapport au niveau de contamination réel de l’environnement

Les mesures mises en œuvre pour connaître l’état de contamination de l’environnement sont les plans de contrôle environnementaux. La Figure 72 représente la probabilité de détection journalière d’une contamination de l’environnement en fonction du risque d’observer au moins un cas de listériose pour les lots sortis d’usine cette même journée. Les scénarios dont les observations sont représentées sont le scénario de référence (en bleu) et les scénarios pour lequel les variations par rapport au scénario de référence concernent le niveau de primo-contamination dans le milieu de la zone d’affinage (scénario 1 et 2, en jaune et en vert respectivement).



**Figure 72** Risque d’observer au moins un cas de listériose pour les lots sortis d’usine la même journée en fonction de la probabilité de détection dans l’environnement ce jour. Les observations bleu correspondent au scénario de référence et les observations jaunes (respectivement vertes) correspondent au scénario 1 (respectivement 2).

On constate que, pour une probabilité de détection donnée, divers niveaux de risque sont associés. Ceci s’explique par le fait que le résultat d’une analyse microbiologique dans l’environnement (détection ou non détection) dépend du nombre de colonies dans l’environnement et non du nombre de cellules. La prise en compte de la probabilité de détection de la contamination dans l’environnement (ou du pourcentage d’analyses positives) n’a donc pas de pouvoir prédictif quant au risque encouru par les consommateurs car ce risque dépend aussi du nombre de cellules (cf. section ci-dessus).

De plus, l’observation de l’augmentation de la probabilité de détection dans l’environnement, et donc du pourcentage d’analyses positives, peut correspondre à différents cas de figure :

- Dans le cadre d’un plan de contrôle renforcé, suite à une analyse positive, auquel cas, la probabilité de détection augmente, même si le niveau de contamination de l’environnement n’augmente pas significativement. Dans ce cas, les mesures d’hygiène sont renforcées, le niveau de contamination des produits et le risque associé à un lot diminue. Ceci est visible sur la Figure 72 : les données du scénario 2, représentées en vert, montrent que, pour les probabilités de détection les plus élevées, les niveaux de risque maximaux associés sont plus petits que pour les probabilités les plus faibles,

- Dans le cadre d'une augmentation significative du niveau de contamination de l'environnement.

Pour le gestionnaire du risque, ces deux cas de figures sont opposés puisqu'ils sont respectivement associés à une diminution et à une augmentation du risque.

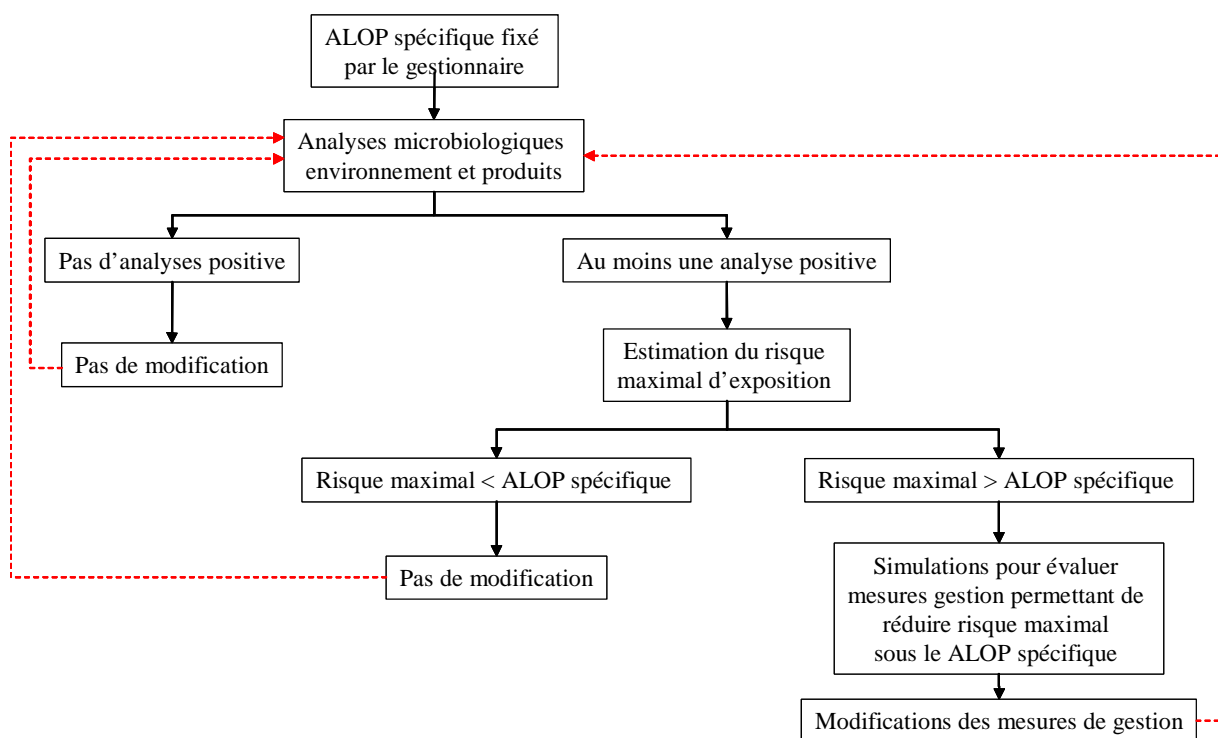
Concernant les plans de contrôles produits, la probabilité de détection de produits contaminés, et donc le pourcentage d'analyses positives de produit, dépendant de la prévalence, les résultats des plans de contrôle des produits permettent de prédire le risque maximal associé à l'ensemble des lots sortis d'usine le même jour. Cependant de la même manière que pour l'environnement, l'augmentation du pourcentage d'analyses positives des produits peut être associée au passage au plan de contrôle renforcé, et donc à la diminution du risque réel, ou à l'effective augmentation du risque associé à l'ensemble des lots sortis d'usine le même jour.

Ainsi, de manière générale, la prudence s'impose quant à l'interprétation des résultats des plans de contrôle, en période standard ou en période renforcé. Nous verrons dans le paragraphe suivant comment exploiter de manière plus efficace les résultats de ces analyses microbiologiques.

#### d. Recommandations pour la gestion du risque par rapport à un FSO fixé

Nous illustrons dans ce paragraphe l'utilité d'un tel modèle, à terme, pour la gestion du risque au quotidien, dans une usine fabriquant des fromages à pâte molle au lait pasteurisé. L'exemple d'utilisation décrit ci-dessous (Figure 73) suppose que tous les sous-modèles et les valeurs des paramètres du modèle d'appréciation du risque présentés dans cette thèse soient validés et que les résultats des simulations correspondent à la réalité. Nous nous plaçons dans le cadre simple d'une primo-contamination du milieu de l'environnement d'affinage. Les paramètres considérés sont ceux du scénario de référence.





**Figure 73 Exemples d'utilisation du modèle d'appréciation de l'exposition pour la gestion du risque de listériose**

Considérons que le gestionnaire du risque détermine pour une usine un niveau de risque auquel il peut exposer ses consommateurs. Supposons que ce risque s'exprime sous forme d'une probabilité d'observer au moins un cas de listériose suite à la consommation de l'ensemble des produits sortis d'usine le même jour. Ce risque s'apparente à un ALOP spécifique à l'usine, ci-après appelé « ALOP spécifique ». Le gestionnaire a pour objectif de ne jamais dépasser cet ALOP spécifique.

Supposons que le gestionnaire est confronté à une contamination du milieu de l'environnement d'affinage : dans ce cas, il cherche à connaître quel est le risque auquel il expose ses consommateurs. Or les observations du paragraphe III.B.3. de ce chapitre montrent que ce risque, pour un certain niveau de contamination de l'environnement donné, présente une grande variabilité et que le risque est maximal est atteint lorsque les colonies de l'environnement ont atteint leur taille maximale (les jours les plus éloignés des opérations d'hygiène).

Ainsi si les analyses microbiologiques dans l'environnement sont suffisamment espacées, dans le temps, des dernières opérations d'hygiène dans l'environnement, on peut supposer que les colonies ont atteint leur taille maximale. Dans ce cas, une quantification du nombre de cellules dans l'échantillon permettra d'obtenir la

concentration surfacique en nombre de colonies par unités de surface et donc une estimation du nombre de colonies dans l'environnement.

La Figure 70, à l'aide de l'estimation du nombre de colonies dans l'environnement, permettra alors de déduire le risque maximal auquel sont exposés les consommateurs. Ce risque peut alors être comparé à l'ALOP spécifique fixé par le gestionnaire. L'obtention de plusieurs valeurs de concentration sur une période de temps restreinte permet d'affiner l'estimation de la concentration surfacique et donc le niveau de risque maximal auquel le consommateur est exposé.

De la même manière pour les produits, le pourcentage de produits détectés contaminés associés à la concentration moyenne des produits contaminés permettra d'estimer le risque auquel les consommateurs sont exposés à partir de la Figure 71. Le risque maximal correspond au cas où la concentration est maximale.

Si l'estimation du risque maximal, obtenu grâce aux analyses microbiologiques de l'environnement ou des produits, est supérieure à l'ALOP spécifique, le gestionnaire doit alors réviser les mesures de maîtrise afin de réduire ce risque d'exposition, notamment les paramètres d'application des mesures d'hygiène. Pour cela, des simulations, avec pour scénario de primo-contamination les résultats des analyses microbiologiques dans l'environnement, peuvent être conduites.

## IV. Discussion

Les avantages apportés par le modèle d'appréciation quantitative du risque proposé dans ce chapitre sont à l'origine de ses inconvénients. En effet, ce modèle complet mais aussi très complexe comporte un grand nombre de paramètres et de sous-modèles. Dans ce contexte, des questions se posent, mettant en relief les précautions à prendre lors de l'utilisation d'un tel modèle. Cependant, sa structure et les premiers résultats de simulation obtenus apportent une valeur ajoutée par rapport aux modèles d'appréciations du risque existants.

Comme un grand nombre de modèles de ce type, sa validation semble difficile à mettre en œuvre. Ainsi, dans un premier temps, une « validation par morceaux » peut être conduite. Pour cela, un travail similaire à celui effectué pour les soins mécaniques doit être mis en œuvre pour chaque phénomène. La validation de l'assemblage des sous-modèles peut se faire à l'aide de données sur des souches plus fréquemment isolées dans l'environnement et dans les produits, tels que les coliformes. Le présent modèle se basant sur des scénarios de primo-contamination préalablement choisis et difficilement évaluable en situation réelle, il serait judicieux de s'affranchir de cette notion en se confrontant à des niveaux de contamination par un microorganisme résultant d'un apport constant par le lait cru. De plus, les paramètres des sous-modèles

doivent être estimés, impliquant des expérimentations en conditions réelles, à l'instar des modèles de contamination croisée pendant les soins.

Certaines hypothèses du modèle, peu réalistes, mais permettant une simplification du modèle, nécessitent des études plus approfondies. C'est le cas des paramètres des modèles de croissance dans les produits, estimés à partir d'ajustement sur divers jeux de données de la littérature, collectés dans des contextes différents. Ainsi, la distinction cœur/croûte n'est pas faite pour les paramètres  $\mu_{opt}$  et  $X_{max}$  alors que ces matrices ont des influences distinctes sur la croissance de *L. monocytogenes*, en termes d'oxygénation, de présence de vitamines, de nutriments, et d'espace physique. De plus, de récentes études (Sym'Previus, non publiées) montrent que la valeur  $\mu_{opt}$  en surface des fromages peut atteindre 0,8 alors que celle utilisée dans le cadre du modèle est égale à 0,21, induisant un taux de croissance instantané inférieur à celui appliqué aux cellules du sol du hâloir, égal à 0,3. Concernant la perte de cultivabilité associée à un stress ou une succession de stress, celle-ci n'a pas encore été validée en conditions réelles. De plus, les éventuels phénomènes d'adaptation progressive au stress ne sont pas pris en compte ici. Enfin, la variabilité des paramètres physico-chimiques (Température, pH, aw) n'a pas été prise en compte alors que celle-ci est très importante au sein même d'un produit. Concernant l'environnement, la croissance de *L. monocytogenes* sur les machines n'a pas été modélisée et l'on n'observe donc pas la formation de réservoir de cellules, comme observé au Chapitre II. La fréquence des opérations d'hygiène sur la machine de soins laisse penser que la probabilité de croissance reste, bien heureusement, très rare, mais une option de croissance sur la machine d'emballage pourrait être prise en compte, lors d'une extension du modèle. Dans le cadre du modèle, l'impact de la contamination d'une machine se situe au niveau de la détection précoce d'une contamination de l'environnement car les machines sont analysées tous les jours.

La contamination du milieu du hâloir nécessite aussi des investigations plus poussées. Notamment, la répartition homogène des colonies dans le hâloir semble peu probable. De plus, dans la réalité industrielle, le passage en régime renforcé implique généralement le ciblage des zones de l'environnement prélevées, lorsqu'une analyse est positive, ce qui suggère le regroupement des colonies dans un espace plus restreint.

La modélisation des opérations d'hygiène correspond à l'application d'un gel désinfectant suivi d'un rinçage doux, alors que l'action mécanique des jets lors du rinçage implique un détachement partiel des cellules du sol. Cependant, il est montré que, dans la réalité, ce détachement s'avère très difficile du fait de la présence des colonies dans les nombreuses anfractuosités du sol, difficilement accessibles au nettoyage. De plus, nous avons fait le choix de ne pas intégrer dans le modèle une éventuelle résistance induite par les opérations d'hygiène, qui implique une persistance plus grande des souches dans l'environnement.

Enfin, les contaminations secondaires chez le consommateur ne sont pas intégrées au modèle malgré la littérature récente abondante sur la modélisation de ces phénomènes. Dans le cadre de l'extension du modèle, un module en tenant compte devrait être ajouté.

Malgré ces incertitudes, le modèle proposé fait l'objet d'une réelle contribution méthodologique à l'appréciation quantitative du risque. Il intègre simultanément de multiples phénomènes influençant le niveau de contamination des produits et de l'environnement (les contaminations secondaires, la croissance et les stress subis par les bactéries, etc.). De plus le modèle est organisé hiérarchiquement grâce à l'emboîtement successif de processus élémentaires évoluant chacun sur leur propre échelle de temps. Sa dynamique globale résulte des interactions multiples entre ces processus. Ainsi il est possible de comprendre comment certains comportements collectifs émergent à partir des éléments constitutifs du modèle d'un niveau plus microscopique mais également comment les processus globaux affectent à leur tour les dynamiques locales.

La construction d'un tel modèle s'est avérée possible grâce à la stratégie de modélisation choisie : suivre les colonies dans l'espace et dans le temps. Cette approche, bien que discutable, constitue l'innovation majeure de ce travail et il est probable qu'à l'avenir ce raisonnement s'appliquera dans le cadre des travaux de recherche contenant des aspects microbiologiques en milieu solide.

Enfin, sa structure permet une réutilisation et une modification des concepts proposés, sans en transformer sa nature. Cela fait de lui un modèle générique, adaptables à des procédés et des germes divers.

A ce stade de l'étude, les exemples de résultats de simulation fournis sont encourageants. Tout d'abord, l'analyse de sensibilité a montré que les paramètres ayant un impact sur le risque de listériose  $r_{200j}$  confirment l'utilité de mesures de maîtrise appliquées en industrie agro-alimentaire. Ainsi, la diminution de la probabilité de contact entre un produit et une colonie de l'environnement se traduit dans la réalité industrielle par le fait que les produits sont souvent installée sur la troisième ou quatrième claie d'une pile (à partir du sol) et par la pose d'une feuille sur la première claie, afin d'éviter les projections provenant du sol sur les produits. De même, un faible temps de duplication des cellules se traduit dans la réalité par le maintien des sols d'affinage au sec, dans l'objectif de restreindre la quantité de nutriments et d'eau, ainsi que la dispersion des cellules dans l'espace.

Ensuite, les risques de listériose estimés sont plausibles pour les scénarios de primo-contamination choisis. Ils montrent que dans un contexte de mesures d'hygiène correctement appliquées, les risques de listériose sont proches de 0 et que seule une défaillance importante du système en termes d'hygiène peut engendrer une augmentation de ce risque. Cette notion de défaillance du système se traduit dans la réalité industrielle par l'accroissement des risques en période de surproduction, d'embauche d'intérimaire, peu familiarisé avec les pratiques hygiéniques.

Enfin, les exemples de résultats des simulations sont en accord avec les observations du chapitre II, bien que le faible nombre d'itérations effectuées, dû au temps de calcul relativement élevé pour une seule itération, ne soit pas suffisant. Tout d'abord, une primo-contamination de l'environnement engendre une contamination sous forme de bruit de fond pour l'environnement et les produits. La probabilité de détection d'une contamination est plus ou moins grande, en fonction du niveau de primo-contamination. Notamment, pour

une primo-contamination avec 2000 cellules dans le milieu de la zone d'affinage, l'ordre de grandeur de la proportion de produits contaminés est en accord avec celle estimées au chapitre II. De même la fréquence de détection de la primo-contamination, sous forme sporadique, semble en accord avec les résultats des auto-contrôles issus de ce même chapitre. Enfin, les résultats des plans de contrôle obtenus par simulation illustre l'artefact que représente le pourcentage d'analyses positives lors du passage au régime renforcé, alors que le niveau de contamination sous forme de bruit de fond reste relativement stable.

En termes d'options de gestion du risque telles que définies dans le Codex alimentarius, les exemples de résultats fournis illustrent l'intérêt d'un tel modèle pour leur évaluation. Pour un ALOP fixé, les modèles existants permettent aujourd'hui d'évaluer un FSO et/ou des valeurs pour les concepts en découlant, plus maniable pour l'industriel. Ces critères concernent généralement des paramètres liés au procédé de fabrication ou des paramètres physico-chimiques du produit.

L'apport du présent modèle réside dans la prise en compte de la contamination de l'environnement dans l'évaluation des options de gestion. En effet, un certain niveau de contamination de l'environnement implique un niveau de contamination maximal des produits, comparable à un niveau de risque « tolérable » fixé par le gestionnaire. Ce niveau de contamination de l'environnement n'est pas observable directement mais peut être estimé grâce aux résultats des plans de contrôle. Ainsi, le modèle montre que les résultats d'analyses microbiologiques, lorsqu'ils sont intégrés aux options de gestion, représentent un outil supplémentaire pour la gestion du risque encouru par les consommateurs.

A terme, une analyse de sensibilité poussée, permettant de mettre en évidence les paramètres et entrées du modèle qui contribuent le plus à la variabilité des résultats, ceux qui ne sont pas significatifs ou encore, si certains (et lesquels) interagissent entre eux, sera mise en œuvre. Pour cela, le modèle se présente encore sous la forme d'un programme qu'il est nécessaire d'optimiser, voire simplifier, afin de réduire les temps de calculs. Il sera alors possible de générer une base de données, issues d'un plus nombre important d'itérations par scénario. L'analyse de sensibilité de cette base de données, par des t, nécessitera la mise en œuvre de méthodes statistiques complexes (par exemple, le data mining, réseau bayésien, etc.), du fait du grand nombre de paramètres du modèle et du nombre de paramètres et de variables d'intérêt.

# CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons proposé un outil de simulation permettant de prédire les conséquences d'une primo-contamination de l'environnement et d'optimiser les mesures de maîtrise d'un procédé. Nous avons appuyé nos hypothèses sur une étude bibliographique approfondie des différents phénomènes susceptible de favoriser la dispersion d'une contamination dans l'environnement. De plus, nous avons, au préalable, tenter de décrire la réalité industrielle en matière de contamination des produits et de l'environnement. De cette étude de terrain et de la revue bibliographique a émergé la nécessité de tenir compte de la particularité d'un milieu solide, telles que les surfaces de l'environnement industriel ou celles des produits en cours de production, dans la modélisation de la dispersion d'une contamination. Cet aspect a été peu exploré jusque là, tant au niveau expérimental qu'au niveau de la modélisation.

Le modèle proposé est innovant puisqu'aucun autre modèle de la littérature ne tient compte transversalement de toutes les voies de contamination et de la dynamique de croissance des pathogènes. Il fournit une synthèse bibliographique de tous les éléments aujourd'hui intégrables dans une appréciation quantitative des risques microbiologiques, notamment des éléments non pris en compte jusqu'à maintenant tels que les stress subis par les microorganismes, l'application des modèles de microbiologie prévisionnelle en conditions physico-chimiques dynamiques, la recontamination et la contamination croisée. Enfin, sans en changer sa structure, il est possible d'ajouter, d'enlever et/ou de modifier le procédé de fabrication, en fonction des technologies considérées, et donc, d'être continuellement amélioré. Les perspectives pour ce modèle sont son optimisation en terme d'implémentation et d'exécution, actuellement encore assez lourdes, qui permettront à terme de disposer d'un outil de simulation rapide, et donc de tester un plus grand nombre de scénarios, avec un plus grand nombre d'itérations. L'étude de sensibilité par des techniques statistiques poussées est également un nouveau défi.

La validation du modèle proposé reste entière et constitue en soi un travail colossal. Elle est de plus préliminaire à toute utilisation du modèle sur le terrain. Cette validation concerne d'une part la structure du modèle proprement dite, mais aussi les paramètres. L'étude ciblée de la contamination croisée au cours des soins des fromages à croûte lavée est un exemple représentatif de la quantité de travail à mettre en œuvre pour valider une partie du modèle. Le présent modèle se basant sur des scénarios de primo-contamination préalablement choisis et difficilement évaluable en terrain réel, il serait judicieux de s'affranchir de cette notion en se confrontant à des niveaux de contamination par un microorganisme résultant d'un apport constant par le lait cru. Un autre type de validation à grande échelle serait de tester les résultats du modèle de simulation à différents stades du procédé de fabrication, sur une bactérie technologique inoculée dans le lait.

Les exemples de résultats des simulations montrent leur intérêt pour la maîtrise quotidienne du danger par le gestionnaire. Tant en termes de comparaison de procédé, que d'évaluation du risque proprement dite, ce type de modèle permet d'identifier les paramètres et étapes du procédé amplifiant ce risque, et de les hiérarchiser. A terme, il met en évidence ceux sur lesquels des études expérimentales plus approfondies sont nécessaires. Enfin, il permet l'identification des leviers majeurs de maîtrise et l'optimisation des mesures de maîtrise, préventives et correctives. Ainsi, face aux exigences croissantes des consommateurs en matière de salubrité et de qualité nutritionnelle des aliments, ces travaux montrent l'intérêt de l'AQR pour la maîtrise des dangers microbiologiques dans les aliments, en complément des connaissances acquises précédemment dans les domaines de l'hygiène et de la maîtrise de l'écologie microbienne des environnements industriels.

Ainsi, l'application d'une démarche scientifique de modélisation de processus complexes fournit aux industriels un outil de maîtrise du danger leur permettant de s'affranchir de l'approche semi empirique adoptée jusque là. Ce type d'approche implique tout de même une certaine ouverture d'esprit. En effet, l'utilisation de ce modèle requiert la connaissance de diverses notions, de la microbiologie aux mathématiques, en passant par l'approfondissement de certains procédés industriels. Or, l'intégration de ce type d'outil, et plus généralement l'utilisation des mathématiques appliquées, dans l'industrie agro-alimentaire, semblent inévitables, ce qui implique à terme une collaboration étroite entre spécialistes de divers disciplines. Une des originalités de ce travail de thèse est précisément le fait qu'il résulte d'un dialogue constant entre mathématiciens, agronomes, vétérinaires, biologistes, industriels, chacun contribuant à la richesse du résultat final.

# BIBLIOGRAPHIE

- Alban, L. and Stark, K. D. (2005). Where should the effort be put to reduce the Salmonella prevalence in the slaughtered swine carcass effectively? *Prev Vet Med* **68**, 63-79.
- Alliot, M. (1999). Ecologie microbienne des sites industriels fromagers : Identification, caractérisation des flores isolées, et étude des facteurs régissant leur implantation, Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon.
- Altekruse, S. F., Cohen, M. L. and Swerdlow, D. L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging infectious diseases* **3**, 285-293.
- Anonymous (1995). Application of risk analysis to food standard issues, Report of a joint FAO/OMS Expert consultation.
- Anonymous (1997a). The application of risk communication to food standards and safety matters, Report of a joint FAO/OMS Expert consultation.
- Anonymous (1997b). Guiding principles for Monte Carlo analysis, US Environmental Protection Agency.
- Anonymous (1997c). Principes régissant l'établissement et l'application des critères microbiologiques pour les aliments, Codex alimentarius Commission.
- Anonymous (1997d). Risk management and food safety, Report of a joint FAO/OMS Expert consultation.
- Anonymous (1999). Risk assessment of microbiological hazards in food - Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment, Report of a joint FAO/WHO expert consultation.
- Anonymous (2002a). Principles and guidelines for incorporating microbiological risk assessment in the development of food safety standards, guidelines and related texts, Report of a joint FAO/WHO consultation.
- Anonymous (2002b). Risk assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens, Technical Report - Microbiological Risk Assessment Series, No. 2, WHO.
- Anonymous (2003a). Codex Alimentarius Food Hygiene Basic Texts, Codex alimentarius Commission - Joint FAO / WHO Food Standards Programme.
- Anonymous (2003b). First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Canada Communicable Disease Report* **23**, 181-186.
- Anonymous (2003c). Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water - Microbiological Risk Assessment Series, No. 3, WHO.



- Anonymous (2004a). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: Meeting report - Microbiological Risk Assessment Series, No. 6, WHO.
- Anonymous (2004b). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Technical report - Microbiological Risk Assessment Series, No. 5, WHO.
- Anonymous (2005a). Impact of Food Safety Objectives on Microbiological Food Safety Management. Proceedings of a workshop held on 9–11 April 2003 Marseille, France. *Food Control* **16**, 775-832.
- Anonymous (2005b). Rapport de la 37ème session du comité du Codex sur l'hygiène alimentaire in III, A. A.
- Augustin, J. C. (1999). Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments, Thèse de doctorat. Université Claude Bernard - Lyon I.
- Augustin, J. C., Zuliani, V., Cornu, M. and Guillier, L. (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1019-1042.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A. M., Aarnisalo, K., Björkroth, J., Mattila-Sandholm, T. and Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 150-155.
- Aziza, F., Mettler, E., Daudin, J.-J. and Sanaa, M. (2006). Stochastic, compartmental, and dynamic modeling of cross-contamination during mechanical smearing of cheeses. *Risk Analysis* **26**, 731-745.
- Baranyi, J., Roberts, T. A. and McClure, P. (1993). A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* **10**, 43-59.
- Bemrah, N., Bergis, H., Colmin, C., Beaufort, A., Millemann, Y., Dufour, B., Benet, J. J., Cerf, O. and Sanaa, M. (2003). Quantitative risk assessment of human salmonellosis from the consumption of a turkey product in collective catering establishments. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 17-30.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M. H., Griffiths, M. W. and Cerf, O. (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine* **37**, 129-145.
- Beresford, M. R., Andrew, P. W. and Shama, G. (2001). *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 1000-1005.
- Berrang, M. E., Meinersmann, R. J., Franck, J. F., Smith, D. P. and Genzlinger, L. L. (2005). Distribution of *Listeria monocytogenes* Subtypes within a Poultry Further Processing Plant. *Journal of Food Protection* **68**, 980-985.
- Bourion, F., Cerf, O. and Meylheuc, T. (1996). Disinfection efficacy against pure-culture and mixed-population biofilms of *Listeria innocua* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, Teflon® and rubber. *Sciences des aliments* **16**, 151-166.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J. P., Rosso, L. and Tomassone, R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *International Journal of Food Microbiology* **40**, 185-195.
- Bremer, P. J., Fillery, S. and McQuillan, A. J. (2006). Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 254-262.
- Buchanan, R. L., Smith, J. L. and Longa, W. (2000). Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 159-172.
- Buchanan, R. L. and Whiting, R. C. (1998). Risk assessment: A means for linking HACCP plans and public health. *Journal of Food Protection* **61**, 1531-1534.
- Buchanan, R. L., Whiting, R. C. and Damert, W. C. (1997). When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiology* **14**, 313-326.
- Bula, C. J., Bille, J. and Glauser, M. P. (1995). An epidemic of food borne listeriosis in Western Switzerland: Description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases* **20**, 66-72.

- Burfoot, D., Reavell, S., Tuck, C. and Wilkinson, D. (2003). Generation and dispersion of droplets from cleaning equipment used in the chilled food industry. *Journal of Food Engineering* **58**, 343-353.
- Carpentier, B. and Cerf, O. (1999). Biofilms in Robinson, R. K., Batt, C.A. and Patel, P.D. (Ed), *Encyclopedia of Food Microbiology, Vol. 1*, Academic Press, pp. 252-259.
- Carpentier, B. and Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 111-122.
- Cassin, M. H., Lammerding, A. M., Todd, E. C. D., Ross, W. and McColl, R. S. (1998a). Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef hamburgers. *International Journal of Food Microbiology* **41**, 21-44.
- Cassin, M. H., Paoli, G. M. and Lammerding, A. M. (1998b). Simulation modeling for Microbial risk assessment. *Journal of Food Protection* **61**, 1560-1566.
- Chae, M. S. and Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* **62**, 103-111.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B. and Hebraud, M. (2004). Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. *FEMS Microbiology Letters* **236**, 241-248.
- Chavant, P., Martinez, B., Meylheuc, T., Bellon- Fontaine, M.-N. and Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 728-737.
- Chen, Y., Jackson, M. J., Chea, F. P. and Schaffner, D. W. (2001). Quantification and variability analysis of bacterial cross contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection* **64**, 72-80.
- Chmielewski, R. A. N. and Franck, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety* **2**, 22-32.
- Christensen, B., Sommer, H., Rosenquist, H. and Nielsen, N. (2001). Risk assessment on *Campylobacter jejuni* in chicken product, The Danish Veterinary and Food Administration.
- Coleman, M. E. and Marks, H. M. (1999). Qualitative and quantitative risk assessment. *Food Control* **10**, 289-297.
- Cooper, K. E. (1963). *The theory of antibiotic inhibition zones*. Academic press.
- Corsetti, A., Rossi, J. and Gobetti, M. (2001). Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 1-10.
- Covello, V. T. and Merkhofer, M. W. (1993). *Risk Assessment Methods - approaches for assessing health and environmental risks*. Plenum Press.
- De Buyser, M.-L., Dufour, B., Maire, M. and Lafarge, V. (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised contries. *International Journal of Food Microbiology* **67**, 1-17.
- De Jesus, A. J., Olsen, A. R., Bryce, J. R. and Whiting, R. C. (2004). Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *International Journal of Food Microbiology* **93**, 259-262.
- De Santis, E. P. L., Mazzette, R., Tedde, T., Dore, R., Scarano, C. and Meloni, D. (2004). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Sheep's Cheese-processing Plants. *Analyse des risques et Listeria monocytogenes - 5ème Conférence Internationale ASEPT. Laval, France*.
- den Aantrekker, E., Boom, R. M., Zwietering, M. H. and van Schothorst, M. (2003a). Quantifying recontamination through factory environments - a review. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 117-130.
- den Aantrekker, E. D. (2002). Recontamination in food processing - quantitative modelling for risk assessment, PhD thesis. Wageningen University, pp. 128.

- den Aantrekker, E. D., Beumer, R. R., S.J.C., v. G., Zwietering, M. H., van Schothorst, M. and Boom, R. M. (2003b). Estimating the probability of recontamination via the air using Monte Carlo simulations. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 1-15.
- den Aantrekker, E. D., Vernooij, W.W., Reij, M.W., Zwietering, M.H., Beumer, R.R., van Schothorst, M., Boom, R.M. (2003). A biofilm model for flowing systems in the food industry. *Journal of Food Protection* **66**, 1432-8.
- Dens, E. J. and Van Impe, J. F. (2000). On the importance of taking space into account when modeling microbial competition in structured food products. *Mathematics and Computers in Simulation* **53**, 443-448.
- Dens, E. J., Vereecken, K. M. and Van Impe, J. F. (1999). A prototype model structure for mixed microbial populations in homogeneous food products. *Journal of theoretical biology* **201**, 159-70.
- Duffy, S. and Schaffner, D. W. (2002). Monte Carlo simulation of the risk of contamination of apples with *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* **78**, 245– 255.
- Dufour, B., De Buyser, M.-L., Brisabois, A., E., E. and Delmas, G. (2004). La sécurité microbiologique : implication du lait et des produits laitiers dans les maladies infectieuses d'origine alimentaire. *Conférence Recherche Européenne Arilait. La sécurité des produits laitiers. Quels nouveaux progrès ? Paris, France.*
- Ebel, E., Schlosser, W., Kause, J., Orloski, K., Roberts, T., Narrod, C., Malcolm, S., Coleman, M. and Powell, M. (2004). Draft risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* 0175:H7 in ground beef. *Journal of Food Protection* **67**, 1991–1999.
- Evers, E. G. (2004). Predictive quantitative effect of logistic slaughter on microbial prevalence. *Preventive Veterinary Medicine* **65**, 31-46.
- Francois, K., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2006). Risk assessment of *Listeria monocytogenes*: impact of individual cell variability on the exposure assessment step. *Risk Analysis* **26**, 105-114.
- Frank, J. F., Ehlers, J. and Wicker, L. (2003). Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Protection Trends* **23**, 654-663.
- Frank, J. F. and Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection* **53**, 550-554.
- Frey, H. C. and Patil, S. P. (2002). Identification and Review of Sensitivity Analysis Methods. *Risk Analysis* **22**, 553-578.
- Fujikawa, H. and Morozumi, S. (2005). Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7920-6.
- Gallagher, D. L., Ebel, E. D. and Kause, J. R. (2003). FSIS risk assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats, USDA, FSIS.
- Gardner, I. A. (2004). An epidemiologic critique of current microbial risk assessment practices: the importance of prevalence and test accuracy data. *Journal of Food Protection* **67**, 2000-2007.
- Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. and Holah, J. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 41-48.
- Gill, C. O., Badoni, M. and McGinnis, J. C. (1999). Assessment of the adequacy of cleaning of equipment used for breaking beef carcasses. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 1-8.
- Gombas, D. E., Chen, Y., Clavero, R. S. and Scott, V. N. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods. *Journal of Food Protection* **66**, 559-569.
- Goulet, V., de Valk, H., Pierre, O., Stainer, F., Rocourt, J., Vaillant, V., Jacquet, C. and Desenclos, J. C. (2001). Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987-1997. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 983-989.

- Goulet, V., Jacquet, C., Martin, P., Vaillant, V., Laurent, E. and de Valk, H. (2004). Surveillance de la listériose humaine en France, 2001. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* **9**, 33-34.
- Guillier, L. (2005). Variabilité des temps de latence cellulaires de *Listeria monocytogenes* en fonction des stress subis et des conditions de re-croissance, Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Hartnett, E., Kelly, L., Newell, D., Wooldridge, M. and Gettinby, G. (2001). A quantitative risk assessment for the occurrence of campylobacter in chickens at the point of slaughter. *Epidemiology and Infection* **127**, 195-206.
- Harvey, J. and Gilmour, A. (2001). Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 840-847.
- Havelaar, A. H., Nauta, M. J. and Jansen, J. T. (2004). Fine-tuning Food Safety Objectives and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* **93**, 11-29.
- Helke, D. M., Somers, E. B. and Wong, A. C. L. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection* **56**, 479-484.
- Helke, D. M., Wong, A.C.L. (1994). Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection* **57**, 963-968.
- Herbert, K. C. and Foster, S. J. (2001). Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology* **147**, 2275-2284.
- Hitchins, A. D. and Whiting, R. C. (2001). Food-borne *Listeria monocytogenes* risk assessment. *Food Addit. Contam.* **18**, 1108-1117.
- Holah, J. T., Taylor, J. H. and Holder, J. S. (1993). The spread of *Listeria* by cleaning systems, part 2. Campden & Chorleywood Food Research Association, Technical Memorandum No. 590.
- Hood, S. K. and Zottola, E. A. (1995). Biofilm in food processing. *Food Control* **6**, 9-18.
- Hope, B. K., Baker, R., Edel, E. D., Hogue, A. T., Schlosser, W. D., Whiting, R., Mc Dowell, R. M. and Morales, R. A. (2002). An overview of the *Salmonella enteritidis* risk assessment for shell eggs and egg products. *Risk Analysis* **22**, 203-218.
- Hutchison, M. L., Thomas, D. J. I., Moore, A., Jackson, D. R. and Ohnstad, I. (2005). An evaluation of raw milk microorganisms as markers of on-farm Hygiene practices related to milking. *Journal of Food Protection* **68**, 764-772.
- ICMSF (2002). *Microbiological testing in food safety management*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- ILSI (2005). Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis - A risk-based approach. *Journal of Food Protection* **68**, 1932-1994.
- Ivanek, R., Gröhn, Y. T., Wiedmann, M. and Wells, M. T. (2004). Mathematical model of *Listeria monocytogenes* cross-contamination in a fish processing plant. *Journal of Food Protection* **67**, 2688-2697.
- Jacquet, C., Rocourt, J., Reynaud, A. (1993). Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. *International Journal of Food Microbiology* **20**, 13-22.
- Jacquet, C., Saint-Clément, C., Brouille, F., Catimel, B., Rocourt, J. (1998). La listériose humaine en France en 1997. Données du centre national de référence des *Listeria*. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* **33**.
- Jessen, B. and Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51**, 265-269.
- Jordan, D., McEwen, S. A., Lammerding, A. M., McNab, W. B. and Wilson, J. B. (1999a). Pre-slaughter control of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a simulation study. *Preventive Veterinary Medicine* **41**, 55-74.

- Jordan, D., McEwen, S. A., Lammerding, A. M., McNab, W. B. and Wilson, J. B. (1999b). A simulation model for studying the role of pre-slaughter factors on the exposure of beef carcasses to human microbial hazards. *Preventive Veterinary Medicine* **41**, 37-54.
- Kalmokoff, M. L., Austin, J. W., Wan, X.-D., Sanders, G., Banerjee, S. and Farber, J. M. (2001). Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 725-734.
- Kanbakan, U., Çon, A. H. and Ayar, A. (2004). Determination of microbiological contamination sources during ice cream production in Denizli, Turkey. *Food Control* **15**, 463-470.
- Kang, Y. J. and Frank, J. F. (1989a). Biological aerosols: a review of airborne contamination and its measurement in dairy processing plants. *Journal of Food Protection* **52**, 512-524.
- Kang, Y.-J. and Frank, J. F. (1989b). Evaluation of air samplers for recovery of biological aerosols in dairy processing plants. *Journal of Food Protection* **52**, 655-659.
- Kells, J. and Gilmour, A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *International Journal of Food Microbiology* **91**, 167-174.
- Kono, T. (1968). Kinetics of microbial cell growth. *Biotechnology and Bioengineering* **10**, 105-131.
- Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. and Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 227-236.
- Kusumaningrum, H. D., van Asselt, E. D., Beumer, R. R. and Zwietering, M. H. (2004). A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. *Journal of Food Protection* **67**, 1892-1903.
- Kutalik, Z., Razaz, M. and Baranyi, J. (2005). Connection between stochastic and deterministic modelling of microbial growth. *Journal of theoretical biology* **232**, 285-299.
- Langsrud, S., Sidhu, M. S., Heir, E. and Holck, A. L. (2003). Bacterial disinfectant resistance-a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51**, 283-290.
- Lappi, V. R., Thimothe, J., Nightingale, K. K., Gall, K., Scott, V. N. and Wiedmann, M. (2004). Longitudinal studies on *Listeria* in smoked fish plants: impact of intervention strategies on contamination patterns. *Journal of Food Protection* **67**, 2500-2514.
- Larson, A. E., Johnson, E. A. and Nelson, J. H. (1999). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science* **82**, 1860-1868.
- Le Marc, Y. (2001). Developpement d'un modèle modulaire décrivant l'effet des interactions entre les facteurs environnementaux sur les aptitudes de croissance de *Listeria*, Thèse de doctorat. Université de Bretagne Occidentale.
- Lee, S. and Frank, J. F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* using hypochlorite and heat. *Journal of Food Protection* **54**, 4-6.
- Lerliche, V. (1999a). Minimisation de l'implantation de *Listeria monocytogenes* sur les surfaces des ateliers alimentaires par la création et l'entretien des biofilms, Université de Bourgogne.
- Lerliche, V. (2000). *Listeria monocytogenes* dans les fromages, Fédération Nationale des Appellations d'Origine Contrôlée.
- Lerliche, V. and Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 594-605.
- Lerliche, V., Chassaing, D., Carpentier, B. (1999b). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* **51**, 169-182.
- Lindqvist, R., Sylven, S. and Vagsholm, I. (2002). Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* **78**, 155-170.

- Lindqvist, R. and Westöö, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 181-196.
- Lou, Y. and Yousef, A. E. (1996). Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection* **59**, 465-471.
- Lunden, J., Autio, T., Markkula, A., Hellstrom, S. and Korkeala, H. (2003a). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 265-272.
- Lunden, J., Tolvanen, R. and Korkeala, H. (2004). Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science* **87**(E. Suppl.), E6-E11.
- Lunden, J. M., Autio, T. J., Sjöberg, A.-M. and Korkeala, H. J. (2003b). Persistent and non persistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection* **66**, 2062-2069.
- Lunden, J. M., Miettinen, M. K., Autio, T. J. and Korkeala, H. J. (2000). Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *Journal of Food Protection* **63**, 1204-7.
- Maijala, R., Ranta, T. J., Seuna, E., Pelkonen, S. and Johansson, T. (2005). A quantitative risk assessment of the public health impact Finnish *Salmonella* control program for broilers. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 21-35.
- Malakar, P. K., Barker, G. C. and Peck, M. W. (2004). Modeling the prevalence of *Bacillus cereus* spores during the production of a cooked chilled vegetable product. *Journal of Food Protection* **67**, 939-946.
- Malakar, P. K., Barker, G. C., Zwietering, M. H. and van't Riet, K. (2003). Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology* **84**, 263-272.
- Malakar, P. K., Martens, D. E., van Breukelen, W., Boom, R. M., Zwietering, M. H. and van 't Riet, K. (2002). Modeling the Interactions of *Lactobacillus curvatus* Colonies in Solid Medium: Consequences for Food Quality and Safety. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3432-3441.
- Marks, H. M., Coleman, M. E., Lin, C.-T. and Roberts, T. (1998). Topics in Microbial risk assessment: Dynamic flow tree process. *Risk Analysis* **18**, 309-328.
- Marshall, K. C., Stout, R. and Mitchell, R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of General Microbiology* **68**, 337-348.
- Mattick, K., Durham, K., Domingue, G., Jørgensen, F., Sen, M., D.W., S. and Humphrey, T. (2003). The survival of foodborne pathogens during domestic washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 213-226.
- McGee, P., Scott, L., Sheridan, J. J., Earley, B. and Leonard, N. (2004). Horizontal transmission of *Escherichia coli* O157:H7 during cattle housing. *Journal of Food Protection* **67**, 2651-2656.
- McMeekin, T. A., Olley, J. N., Ross, T. and Ratkowsky, D. A. (1993). *Predictive Microbiology, Theory and Application*. Research studies press LTD.
- McNab, W. B. J. (1998). A general framework illustrating an approach to quantitative microbial food safety risk assessment. *Journal of Food Protection* **61**, 1216-1228.
- Mettler, E. and Carpentier, B. (1998). Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection* **68**, 57-65.
- Midelet, G. and Carpentier, B. (2002). Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 4015-4024.
- Midelet, G. and Carpentier, B. (2004). Impact of cleaning and disinfection agents on biofilm structure and on microbial transfer to a solid model food. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 262-270.
- Midelet, G., Kobilinsky, A. and Carpentier, B. (2006). Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed

- biofilms after contact with a solid model food. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2313-2321.
- Montville, R., Chen, Y. and Schaffner, D. W. (2001). Glove barriers to bacterial cross-contamination between hands to food. *Journal of Food Protection* **64**, 845-849.
- Murphy, R. Y. and Seward, R. A. (2004). Research Note: Process Control and Sampling for *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Trimmings. *Journal of Food Protection* **67**, 1755-1759.
- Nauta, M. J. (2000). Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessments models. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 9-18.
- Nauta, M. J. (2001). A modular process risk model structure for quantitative microbiological risk assessment and its application in an exposure assessment of *Bacillus cereus* in a REPFED, RIVM.
- Nauta, M. J. (2005). Microbiological risk assessment models for partitioning and mixing during food handling. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 311-322.
- Nauta, M. J., Evers, E. G., Takumi, K. and Havelaar, A. H. (2001). Risk assessment of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O157 in steak tartare in the Netherlands, RIVM.
- Nauta, M. J., Jacobs-Reitsma, W. F., Evers, E. G., van Pelt, W. and Havelaar, A. H. (2005a). Risk assessment of *Campylobacter* in the Netherlands via broiler meat and other routes, RIVM.
- Nauta, M. J., Van de Giessen, A. W. and Henken, A. M. (2000). A model for evaluating intervention strategies to control salmonella in the poultry meat production chain. *Epidemiology and Infection* **124**, 365-373.
- Nauta, M. J., van der Fels-Klerx, I. H. J. and Havelaar, A. (2005b). A poultry processing model for quantitative microbiological risk assessment. *Risk Analysis* **25**, 85-98.
- Nelson, J. H. (1990). Where are *Listeria* likely to be found in dairy plants ? *Dairy, Food and Environmental Sanitation* **10**, 344-345.
- Norwood, D. E. and Gilmour, A. (2000). The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 512-520.
- Norwood, D. E. and Gilmour, A. (2001). The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology* **33**, 320-324.
- Notermans, S., Gallhoff, G., Zwietering, M. H. and Mead, G. C. (1995). The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment. *Food microbiology* **12**, 81-90.
- Oliver, S. P., Jayarao, B. M. and Almeida, R. A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogens and Disease* **2**, 115-129.
- Oscar, T. P. (2004). A quantitative risk assessment model for Salmonella and whole chickens. *International Journal of Food Microbiology* **93**, 231-247.
- Pak, S.-I., Spahr, U., Jemmi, T. and Salman, M. D. (2002). Risk factors for *Listeria Monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. *Preventive Veterinary Medicine* **53**, 55-65.
- Parsons, D. J., Orton, T. G., D'Souza, J., Moore, A., Jones, R. and Dodd, C. E. R. (2005). A comparison of three modelling approaches for quantitative risk assessment using the case study of Salmonella spp. in poultry meat. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 35-51.
- Pearson, L.-J. and Marth, E. H. (1990). *Listeria monocytogenes* - threat to a safe supply: a review. *Journal of Dairy Science* **73**, 912-928.
- Pedroso, L. M. R. (2005). Considering Recontamination in Food Safety Management Systems (HACCP;ISO 22000). *1st European Conference of the International Association of Food Protection - Recontamination issues in the Food Industry. Prague, Czech Republic.*

- Peneau, S., Chassaing, D. and Carpentier, B. (2007). First evidence of division and accumulation of viable but nonculturable *Pseudomonas fluorescens* cells on surfaces subjected to conditions encountered at meat processing premises. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 2839–2846.
- Pérez, F., Carrasco, E., Valero, A., Fuentes, J. M., García-Gimeno, R. M., Zurera, G. and Todd, E. (2004a). Exposure Assessment of *Listeria monocytogenes* in Cooked Ham. Approach to Cross-contamination in Retail Points. *Poster presented at the 5th ASEPT International Conference: "Listeria monocytogenes and Risk Analysis". Laval, France.*
- Pérez, F., Fuentes, J. M., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R. M. and Zurera, G. (2004b). Transfer of *S. aureus* during cooked meat slicing. *COST 920. Pamplona, Spain.*
- Pinner, R. W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Deaver, K. A., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D., Reeves, M., Broome, C. V. and Wenger, J. D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. II. Microbiologic and epidemiologic investigation. The *Listeria* Study Group. *Journal of the American Medical Association* **267**, 2046-2050.
- Prendergast, D. M., Daly, D. J., Sheridan, J. J., McDowell, D. A. and Blair, I. S. (2004). The effect of abattoir design on aerial contamination levels and the relationship between aerial and carcass contamination levels in two Irish beef abattoirs. *Food Microbiology* **21**, 589–596.
- Pritchard, T. J., Flanders, K. J. and Donnelly, C. W. (1995). Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants. *International Journal of Food Microbiology* **26**, 375-384.
- Ranta, J. and Majjala, R. (2002). A probabilistic transmission model of *Salmonella* in the primary broiler production chain. *Risk Analysis* **22**, 47-58.
- Reij, M., van Asselt, E., Cordier, J.-L. and Gorris, L. (2005). Recontamination as a source of pathogens in processed foods - A literature review, ILSI Europe Report Series. ILSI.
- Reij, M. W., den Aantrekker, E. D. and Force, I. E. R. A. i. M. T. (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology* **91**, 1-11.
- Reinders, R. D., De Jonge, R. and Evers, E. G. (2003). A statistical method to determine whether micro-organisms are randomly distributed in a food matrix, applied to coliforms and *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Food microbiology* **20**, 297-303.
- Robbins, J. B., Fisher, C. W., Moltz, A. G. and Martin, S. E. (2005). Elimination of *Listeria monocytogenes* Biofilms by Ozone, Chlorine, and Hydrogen Peroxide. *Journal of Food Protection* **68**, 494-498.
- Robinson, T. P., Ocio, M. J., Kaloti, A. and Mackey, B. M. (1998). The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 83-92.
- Rocourt, J., Ben Embarek, P., Toyofuku, H. and Schlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **35**, 263-267.
- Rorvik, L. M., Caugant, D.A., Yndestad M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 19-27.
- Rørvik, L. M., Skjerve, E., Knudsen, B. R. and Yndestad, M. (1997). Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing. *International Journal of Food Microbiology* **37**, 215– 219.
- Rosenquist, H., Nielsen, N. L., Sommer, H. M., Norrung, B. and Christensen, B. B. (2003). Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 87-103.
- Ross, T. and McMeekin, T. A. (2003). Modeling microbial growth within food safety risk assessments. *Risk Analysis* **23**, 179-97.
- Ross, T. and Summer, J. (2002). A simple, spreadsheet-based, food safety risk assessment tool. *International Journal of Food Microbiology* **77**, 39-53.



- Rosso, L. (1995). Modélisation et microbiologie prévisionnelle : élaboration d'un nouvel outil pour l'agro-alimentaire, Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon I.
- Rosso, L. (1996). Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology* **81**, 501-508.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J. P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. (1996). Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection* **59**, 944-949.
- Rudolf, M. and Scherer, S. (2001). High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* **63**, 91-98.
- Ryser, E. T. and Marth, E. H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert. *Journal of Food Protection* **50**, 372-378.
- Ryser, E. T., Marth, E.H. (1999). *Listeria, Listeriosis and food safety*. Second Edition. Marcel Dekker Inc.
- Sanaa, M., Coroller, L. and Cerf, O. (2004). Risk assessment of Listeriosis linked to consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. *Risk Analysis* **24**, 389-399.
- Sauli, I., Danuser, J., Geeraerd, A. H., van Impe, J. F., Rüfenacht, J., Bissig-Choisat, B., Wenk, C. and Stärk, K. D. C. (2004). Estimating the probability and level of contamination with Salmonella of feed for finishing pigs produced in Switzerland - the impact of the production pathway. *International Journal of Food Microbiology* **100**, 289-310.
- Sauli, I., Danuser, J., Wenk, C. and Staerk, K. D. C. (2003). A Semiquantitative Approach for Evaluating Safety Assurance Levels for Salmonella spp. throughout a food production chain. *Journal of Food Protection* **66**, 1146-1153.
- Schaffner, D. W. (2004). Mathematical frameworks for modeling *Listeria* cross-contamination in food processing plants. *Journal of Food Science* **69**, R155-R159.
- Schlundt, J. (2000). Comparison of microbiological risk assessment studies published. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 197-2002.
- Schuchat, A., Deaver, K. A., Wenger, J. D., Plikaytis, B. D., Mascola, L., Pinner, R. W., Reingold, A. L. and Broome, C. V. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. The *Listeria* Study Group. *JAMA* **267**, 2081-2082.
- Scott, T. M., Rose, J. B., Jenkins, T. M., Farrah, S. R. and Lukasik, J. (2002). Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 5796-5803.
- Serra, J. A., Domenech, E., Escriche, I. and Martorell, S. (1999). Risk assessment and critical control points from the production perspective. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 9-26.
- Silva, I. M. M., Almeida, R. C. C., Alves, M. A. O. and Almeida, P. F. (2003). Occurrence of *Listeria* spp. in critical control point and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 241-248.
- Spurlock, A. T. and Zottola, E. A. (1991). The survival of *Listeria monocytogenes* in aerosols. *Journal of food protection* **54**, 910-912.
- Stahl, V., Garcia, E., Hezard, B. and Fassel, C. (1996). Prevention of *Listeria monocytogenes* in dairy farms and dairy processing plants. *Pathologie Biologie* **44**, 816-824.
- Swanson, K. M. J. and Anderson, J. E. (2000). Industry Perspectives on the Use of Microbial Data for Hazard Analysis and Critical Control Point Validation and Verification. *Journal of Food Protection* **63**, 815-818.
- Swinnen, I. A., Bernaerts, K., Dens, E. J., Geeraerd, A. H. and van Impe, J. F. (2004). Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 137-159.
- Takhistov, P. and George, B. (2004). Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **26**, 259-270.

- Taormina, P. J. and Beuchat, L. R. (2001). Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2555-2563.
- Taormina, P. J. and Beuchat, L. R. (2002). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food-processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 71-80.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S. and Vernozzy-Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 85-94.
- Thomas, L. V., Wimpenny, J. W. and Barker, G. C. (1997). Spatial interactions between subsurface bacterial colonies in a model system: a territory model describing the inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nisin-producing lactic acid bacterium. *Microbiology* **143**, 2575-2582.
- Toft, N., Innocent, G. T., Mellor, D. J. and Reid, S. W. J. (2006). The Gamma-Poisson model as a statistical method to determine if micro-organisms are randomly distributed in a food matrix. *Food Microbiology* **23**, 90-94.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of food protection* **65**, 709-725.
- Tuominen, P., Hielm, S., Aarnisalo, K., Raaska, L. and Maijala, R. (2003). Trapping the food safety performance of a small or medium-sized food company using a risk-based model. The HYGRAM system. *Food Control* **14**, 573-578.
- Valeeva, N. I., Meuwissen, M. P., Lansink, A. G. and Huirne, R. B. (2005). Improving food safety within the dairy chain: an application of conjoint analysis. *J Dairy Sci* **88**, 1601-12.
- Van der Fels-Klerx, H. J., Cooke, R. M., Nauta, M. N., Goossens, L. H. and Havelaar, A. H. (2005). A structured expert judgment study for a model of *Campylobacter* transmission during broiler-chicken processing. *Risk Analysis* **25**, 109-124.
- van Gerwen, S. J. C. and Gorris, L. G. M. (2004). Application of Elements of Microbiological Risk Assessment in the Food Industry Via a Tiered Approach. *Journal of Food Protection* **67**, 2033-2040.
- van Gerwen, S. J. C., te Giffel, M. C., van 't Riet, K., Beumer, R. R. and Zwietering, M. H. (2000). Stepwise quantitative risk assessment as a tool for characterization of microbiological food safety. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 938-951.
- van Schothorst, M. (1997). Practical approaches to risk assessment. *Journal of Food Protection* **60**, 1439-1443.
- van Schothorst, M. (2004). A simple guide to understanding and applying the hazard analysis and critical control point concept. *International Life Sciences Institute* **3rd edition**.
- Veulemans, A., Jacquemain, E. and Jacquemain, D. (1970). Etude d'une méthode simple pour la détermination du degré de pollution des surfaces et la comparaison du pouvoir désinfectant de divers produits d'entretien. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* **25**, 58-65.
- Vorst, K. L., Todd, E. C., Perez, F., McMasters, R. L. and Ryser, E. T. (2004). Transfer of *Listeria monocytogenes* from a delicatessen slicer to ready-to-eat meat products. *IAFP's 91st Annual Meeting*. Phoenix, Arizona.
- Vorst, K. L., Todd, E.C., Rysert, E.T. (2006). Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna, and salami. *Journal of Food Protection* **69**, 619-626.
- Vose, D. J. (1998). The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *Journal of Food Protection* **61**, 640-648.
- Vose, D. J. (2000). *Risk analysis: a quantitative guide*. John Wiley & Sons.
- Whiting, R. C. (1997). Development of quantitative risk assessment for *Salmonella enteritidis* in pasteurized liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 111-125.
- Wiedmann, M., Scott, V. N., Gall, K., Nightingale, K. K. and Thimothe, J. (2004). Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *Journal of Food Protection* **67**, 328-341.

- Wilson, I. G. (1995). Occurrence of *Listeria* species in ready-to-eat foods. *Epidemiology and Infection* **115**, 519-526.
- Wilson, P. D., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. and van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* **73**, 275-289.
- Yucel, N. and Ulusoy, H. (2006). A Turkey survey of hygiene indicator and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. *Food Control* **17**, 383-388.
- Zwietering, M. H. and van Gerwen, S. J. C. (2000). Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* **58**, 213-221.

# RESUME

## **Maîtrise des dangers microbiologiques en industrie laitière basée sur un modèle d'appréciation quantitative des risques. Application à *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé**

Les progrès de l'appréciation quantitative des risques permettent d'envisager l'utilisation de cette démarche en matière de sécurité microbiologique des aliments. La validation de cette approche en tant qu'outil de maîtrise des dangers microbiologiques fait l'objet de cette thèse, à travers l'exemple de *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé.

Basé sur les résultats d'une analyse statistique rétrospective de données d'auto-contrôles pour *Listeria* provenant de trois industries laitières et sur une synthèse bibliographique de tous les éléments aujourd'hui intégrables dans une appréciation quantitative des risques microbiologiques, nous proposons un modèle complet, permettant d'estimer le risque de listériose au moment de la consommation, en tenant compte de l'ensemble du procédé de fabrication et des sources potentielles de contamination. De la pasteurisation à la consommation, il simule la dispersion et l'amplification d'une primo-contamination de l'environnement de l'usine par *Listeria monocytogenes*, dans le temps, l'espace et entre les produits, en tenant compte de l'impact des mesures de maîtrise telles que les opérations d'hygiène et les plan de contrôles. L'analyse de sensibilité du modèle permet l'identification des leviers majeurs de maîtrise et l'optimisation des mesures préventives et correctives.

Ce modèle, généralisable à d'autres espèces et d'autres procédés, illustre concrètement l'intérêt de l'appréciation quantitative du risque en matière de sécurité alimentaire.

Mots-clés : Modélisation, Appréciation quantitative du risque microbiologiques , contamination par l'environnement

# ABSTRACT

**Risk-based approach for microbial food safety in dairy industry. Application to *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from pasteurized milk.**

Advances in the quantitative risk assessment allow using this approach for food microbiological safety. The validation of this approach as a tool for controlling microbiological hazards in food is the subject of this thesis, through the example of *Listeria monocytogenes* in soft cheese pasteurized milk.

Based on the results of a statistical analysis of data for *Listeria* coming from three dairy industries and a bibliographic synthesis of all the elements that can now be integrated into a quantitative risk assessment, we propose a complete model, estimating the risk of listeriosis at the moment of consumption, taking into account the entire manufacturing process and potential sources of contamination. From pasteurization to consumption, the amplification of a initial contamination of the process environment by *Listeria monocytogenes* is simulated, over time, in space and between products, accounting for the impact of control measures, such as hygien operations and sampling frame. A sensitivity analysis of the model allows for the identification of major parameters contributing to the risk and the optimization of preventive and corrective measures.

This model, which can be adapted to other species and processes, concretely illustrates the interest of the quantitative risk assessment in food safety.

Key-words : Modeling, Microbiological quantitative risk assessment, cheese processcontamination by the environment.



## RESUME

### **Maîtrise des dangers microbiologiques en industrie laitière basée sur un modèle d'appréciation quantitative des risques. Application à *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé**

Les progrès de l'appréciation quantitative des risques permettent d'envisager l'utilisation de cette démarche en matière de sécurité microbiologique des aliments. La validation de cette approche en tant qu'outil de maîtrise des dangers microbiologiques fait l'objet de cette thèse, à travers l'exemple de *Listeria monocytogenes* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé.

Basé sur les résultats d'une analyse statistique rétrospective de données d'auto-contrôles pour *Listeria* provenant de trois industries laitières et sur une synthèse bibliographique de tous les éléments aujourd'hui intégrables dans une appréciation quantitative des risques microbiologiques, nous proposons un modèle complet, permettant d'estimer le risque de listériose au moment de la consommation, en tenant compte de l'ensemble du procédé de fabrication et des sources potentielles de contamination. De la pasteurisation à la consommation, il simule la dispersion et l'amplification d'une primo-contamination de l'environnement de l'usine par *Listeria monocytogenes*, dans le temps, l'espace et entre les produits, en tenant compte de l'impact des mesures de maîtrise telles que les opérations d'hygiène et les plan de contrôles. L'analyse de sensibilité du modèle permet l'identification des leviers majeurs de maîtrise et l'optimisation des mesures préventives et correctives.

Ce modèle, généralisable à d'autres espèces et d'autres procédés, illustre concrètement l'intérêt de l'appréciation quantitative du risque en matière de sécurité alimentaire.

Mots-clés : Modélisation, Appréciation quantitative des risques microbiologiques, contamination par l'environnement, fromage

## ABSTRACT

### **Risk-based approach for microbial food safety in dairy industry. Application to *Listeria monocytogenes* in soft cheese made from pasteurized milk.**

Advances in the quantitative risk assessment allow using this approach for food microbiological safety. The validation of this approach as a tool for controlling microbiological hazards in food is the subject of this thesis, through the example of *Listeria monocytogenes* in soft cheese pasteurized milk.

Based on the results of a statistical analysis of data for *Listeria* coming from three dairy industries and a bibliographic synthesis of all the elements that can now be integrated into a quantitative risk assessment, we propose a complete model, estimating the risk of listeriosis at the moment of consumption, taking into account the entire manufacturing process and potential sources of contamination. From pasteurization to consumption, the amplification of a initial contamination of the process environment by *Listeria monocytogenes* is simulated, over time, in space and between products, accounting for the impact of control measures, such as hygienic operations and sampling frame. A sensitivity analysis of the model allows for the identification of major parameters contributing to the risk and the optimization of preventive and corrective measures.

This model, which can be adapted to other species and processes, concretely illustrates the interest of the quantitative risk assessment in food safety.

Key-words : Modeling, Microbiological quantitative risk assessment, cheese process, contamination by the environment.